

**Stabilisierung von Proteinen durch
in vitro-Evolution –
Selektion und biophysikalische Charakterisierung**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
-Doktor der Naturwissenschaften-
der Fakultät für Biologie, Chemie
und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin

Insa Kather

Bayreuth 2007

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“.

Diese Arbeit wurde von November 2002 bis Februar 2007 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 07. März 2007

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 14. September 2007

Prüfungsausschuß:

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Franz X. Schmid
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Holger Dobbek
Vorsitzender:	Prof. Dr. Wolfgang Schumann
	Prof. Dr. Matthias Ullmann

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Struktur und Stabilität von Proteinen	1
1.2	Einfluß von Disulfidbrücken auf die Proteinstabilität	2
1.3	Bedeutung der Stabilisierung von Enzymen für die Biotechnologie	3
1.4	Ansätze zur Stabilisierung von Proteinen	3
1.5	<i>In vitro</i> -Evolution	5
1.5.1	Varianten des <i>phage display</i>	5
1.5.2	Anwendungen des <i>phage display</i>	7
1.5.3	Vollständig <i>in vitro</i> ablaufende Selektionen	10
1.6	Filamentöse Phagen – Aufbau und Infektion	10
1.7	Struktur und Funktion des Gen-3-Proteins (G3P) filamentöser Phagen	12
1.8	TEM-1 β -Lactamase aus <i>E. coli</i>	13
1.8.1	β -Lactamasen: Klassifizierung, Struktur und Mechanismus	13
1.8.2	TEM-1 β -Lactamase: Struktur und Aktivität	14
1.9	Problemstellung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	18
2.1.2	Oligodesoxyribonukleotide	18
2.1.3	Nährmedien	19
2.1.4	Enzyme	19
2.1.5	Längenstandards	19
2.1.6	Chemikalien und Biochemikalien	19
2.1.7	Verbrauchsmaterialien, Materialien für die Chromatographie	20
2.1.8	Geräte	20
2.1.9	Computer-Software	21
2.2	Elektrophoretische Methoden	21
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.2	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.3	Isolierung und Reinigung von DNA	22
2.3.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Reinigung mit Silica	22
2.3.2	Präparation von einzelsträngiger Phagen-DNA	23
2.3.3	Präparation von doppelsträngiger DNA	23
2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.4.1	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	23
2.4.2	Kolonie-PCR	24
2.4.3	Blunt-end-Mutagenese	24
2.5	QuikChange ortsgerichtete Mutagenese	25
2.6	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.6.1	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.6.2	Herstellung und Transformation CaCl_2 -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.7	Generieren einer Phagenbibliothek	26
2.7.1	Erstellen der Genbibliothek	26
2.7.2	Herstellung der Phagenbibliothek	27
2.8	Arbeiten mit Phagen	28
2.8.1	Propagation und Isolierung von Phagen	28

2.8.2	Bestimmung der Anzahl infektiöser Phagen	28
2.8.3	Proteolyse zur Selektion stabilisierter (Gast)-Proteinvarianten.....	28
2.8.4	Suppression von Phagen mit Cys-Resten an den randomisierten Positionen im G3P.....	29
2.8.5	Bestimmung der Phageninfektiosität	29
2.9	Konstruktion eines Phagen mit N-terminalem <i>Tag</i> am Gen-3-Protein	29
2.9.1	Einführen von Restriktionsstellen und <i>Linker</i> -Bereichen ins Phagengenom	29
2.9.2	Test auf Bindung der Phagen mit N-terminalem Cystein an die Trägermatrix	30
2.9.3	Erstellen einer Phagenbibliothek.....	30
2.9.4	Proteolyse zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten.....	30
2.10	Klonierung selektierter Proteinvarianten	31
2.10.1	Amplifikation aus dem Phagengenom	31
2.10.2	Restriktion.....	31
2.10.3	Ligation und Transformation	32
2.11	Proteinexpression und Reinigung	32
2.11.1	Test auf Überexpression eines Proteins.....	32
2.11.2	Expression und Reinigung der G3P-Varianten	33
2.11.3	Expression und Reinigung der G3P-Konstrukte mit C-terminaler Domäne	34
2.11.4	Expression und Reinigung der β -Lactamase-Varianten	35
2.12	Aktivitätstest der β -Lactamase-Varianten.....	36
2.13	Proteolyse der G3P-Konstrukte	37
2.14	Spektroskopische Charakterisierung.....	37
2.14.1	Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung	37
2.14.2	Circulardichroismus-Spektren.....	38
2.14.3	Fluoreszenzspektren.....	38
2.14.4	Massenspektrometrische Untersuchung der Proteine.....	38
2.15	Bestimmung der konformationellen Proteinstabilität	39
2.15.1	Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge	39
2.15.2	Konzentrationsbestimmung von GdmCl, GdmSCN und Harnstoff	43
2.15.3	Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge.....	43
2.16	Experimente zur Kinetik der Proteinfaltung	46
2.16.1	Kinetik nach manueller Mischung	46
2.16.2	Kinetik nach schneller Mischung.....	46
2.16.3	Auswertung der Kinetik-Messungen.....	47
3	Ergebnisse und Diskussion	49
3.1	Eine stabile disulfidfreie Variante des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd	49
3.1.1	Selektionsstrategie	49
3.1.2	Ersatz der Disulfidbrücke in N2.....	50
3.1.3	Ersatz der Disulfidbrücken in N1	54
3.1.4	GdmCl-induzierte Entfaltung.....	56
3.1.5	Fazit aus dem evolutiven Ersatz der Disulfidbrücken im G3P.....	59
3.1.6	Selektion stabilisierender second-site Mutationen in 1SS-G3P	61
3.1.7	Nah-UV- und Fern-UV-CD-Spektren der G3P*-Varianten mit substituierten Disulfidbrücken	63
3.1.8	Generierung eines stabilen disulfidfreien G3P.....	64
3.1.9	Kombination der stabilisierenden Mutationen im disulfidfreien G3P.....	67
3.1.10	Fazit aus der Stabilisierung durch second-site-Mutationen.....	68
3.1.11	Biologische Funktion der selektierten G3P-Varianten.....	70
3.1.12	Bedeutung des disulfidfreien G3P* für Proside	72

3.2	Struktur und Analyse der Beiträge einzelner Mutationen zur Stabilität des disulfidfreien G3P	73
3.2.1	Analytische 0SS-G3P*-Varianten.....	73
3.2.2	Stabilitätsuntersuchungen mittels verschiedener Sonden	79
3.2.3	Kooperativitätsänderungen der N1-Domänen.....	84
3.2.4	GdmCl-induzierte Entfaltung der 0SS-G3P*-Varianten.....	86
3.2.5	Fazit der Stabilitätsuntersuchungen mit den analytischen 0SS-G3P*-Varianten.....	91
3.2.6	Vergleich der Kristallstrukturen von Wildtyp-G3P und 0SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen	92
3.2.7	Strukturelle Analyse der Mutationen in der N1-Domäne	93
3.2.8	Strukturelle Analyse der Mutationen in der N2-Domäne	98
3.2.9	Strukturelle Analyse der Disulfidbrückensubstitutionen	101
3.2.10	Fazit aus der strukturbasierten Analyse der Stabilitätsdaten.....	102
3.3	Charakterisierung der stabilisierenden Mutationen im disulfidverbrückten G3P*	103
3.3.1	GdmCl-induzierte Entfaltung.....	103
3.3.2	GdmSCN-induzierte Entfaltung.....	105
3.3.3	Thermische Entfaltung des stabilisierten disulfidverbrückten G3P*	107
3.3.4	Fazit aus der Stabilitätsanalyse von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen	111
3.4	Faltung des stabilisierten, disulfidfreien G3P.....	112
3.4.1	Faltungskinetik der isolierten N1-Domäne	112
3.4.2	Faltungskinetiken des N1N2-Fragments.....	115
3.4.3	Faltungskinetik der N2-Domäne.....	120
3.4.4	Vergleich der Faltungskinetik von 3SS-G3P* und 0SS-G3P*	121
3.5	Untersuchung der C-terminalen Domäne des Gen-3-Proteins	123
3.5.1	Ersatz der Disulfidbrücke C354-C371 in der C-terminalen Domäne	124
3.5.2	Klonierung und Reinigung der verschiedenen G3P-Konstrukte mit C-terminaler Domäne...	124
3.5.3	Vergleich der Proteolyseresistenz der verschiedenen G3P*-Konstrukte	125
3.5.4	Spektroskopische Charakterisierung der G3P-Konstrukte.....	127
3.5.5	Fazit der Charakterisierung der G3P*-CT-Konstrukte	134
3.6	Stabilisierung von TEM-1 β -Lactamase durch <i>in vitro</i> -Evolution	136
3.6.1	Selektionsstrategie	136
3.6.2	Zufallsmutagenese und thermische Selektion von Wildtyp- β -Lactamase	136
3.6.3	Zufallsmutagenese und thermische Selektion der disulfidfreien β -Lactamase	142
3.6.4	Sättigungsmutagenese der Positionen 182 und 224	146
3.6.5	Selektion mit dem chemischen Denaturierungsmittel GdmCl.....	148
3.6.6	Thermodynamische Stabilität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration	150
3.6.7	Kombination der stabilisierenden Mutationen	151
3.6.8	Fazit aus der Selektion stabilisierter β -La-Varianten.....	155
3.6.9	Strukturelle Analyse der stabilisierenden Mutationen	156
3.6.10	Faltungskinetik der stabilisierten β -Lactamase-Variante im Vergleich zum Wildtyp-Protein	158
3.6.11	Fazit der <i>in vitro</i> -Evolution von TEM-1 β -Lactamase.....	162
3.7	Etablierung eines alternativen Selektionssystems zur Stabilisierung von Proteinen	164
3.7.1	Evolute Stabilisierung N-terminaler G3P-Fusionsproteine.....	164
3.7.2	Konstruktion eines Phagen mit N-terminalem His ₆ -Tag zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten.....	167
3.7.3	Konstruktion eines Phagen mit N-terminalem Cystein zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten.....	167
3.7.4	Selektion stabilisierter β -Lactamase-Varianten im Selektionssystem mit N-terminalem Cystein-Tag am G3P.....	169

4	Zusammenfassende Diskussion.....	171
4.1	Weiterentwicklung der <i>Proside</i> -Selektionsmethode im Hinblick auf die Stabilisierung großer Proteine.....	171
4.1.1	Substitution der Disulfidbrücken im G3P* N1N2-Fragment.....	171
4.1.2	Selektion stabilisierter Varianten der TEM-1 β -Lactamase aus <i>E. coli</i>	173
4.1.3	Entwicklung eines alternativen Systems zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten	174
4.2	Thermodynamische und strukturelle Charakterisierung des stabilisierten disulfidfreien Gen-3-Proteins filamentöser Phagen	176
4.2.1	Substitution der Disulfidbrücken im G3P - Thermodynamische Charakterisierung.....	176
4.2.2	Durch <i>second-site</i> -Mutationen kann der Verlust von drei Disulfidbrücken überkompensiert werden.....	177
4.2.3	Die Analyse der Kristallstruktur gibt Aufschluß über die stabilisierenden Effekte	179
4.2.4	<i>Second-site</i> -Mutationen sind auch im disulfidverbrückten G3P* extrem stabilisierend	181
4.3	Untersuchung der C-terminalen Domäne des G3P	181
4.4	Thermodynamische Charakterisierung der stabilisierten TEM-1 β -Lactamase.....	183
5	Zusammenfassung.....	187
6	Summary	190
7	Abkürzungsverzeichnis	193
8	Literatur.....	195
9	Anhang.....	203
9.1	Verwendete Oligodesoxyribonukleotide	203
9.2	Enthalpie der thermischen Entfaltung der G3P*-Varianten.....	210
9.3	Daten zur Kristallstruktur des stabilisierten disulfidfreien G3P*	212
9.4	DNA-Sequenzen der Phagen-Konstrukte mit N-terminalem His ₆ -Tag	213

1 Einleitung

1.1 Struktur und Stabilität von Proteinen

Proteine übernehmen vielfältige Funktionen in allen Organismen. Ihre flexible Funktionsweise beruht auf dem strukturellen Aufbau, wobei die Information für die räumliche Struktur in der Primärsequenz festgelegt ist (Anfinsen, 1973). Wechselwirkungen der Aminosäuren führen zur Ausbildung charakteristischer Sekundärstrukturelemente, die in ihrer räumlichen Organisation die Tertiärstruktur des Proteins bilden. Bei Proteinen mit mehreren Polypeptidketten wird deren Anordnung durch die Quartärstruktur beschrieben. Zwar sind intrinsisch unstrukturierte Proteine bekannt, normalerweise faltet sich die Polypeptidkette jedoch zu einer eindeutig definierten nativen Struktur (Uversky, 2002). Angesichts der Komplexität der Polypeptidkette und der sich daraus ergebenden großen Anzahl der Anordnungsmöglichkeiten stellt sich die Frage, warum Proteine in Zeitbereichen von Sekunden oder schneller falten können, da ein zufälliges Absuchen des Sequenzraumes enorm viel Zeit in Anspruch nähme (Levinthal, 1968; Levinthal, 1969). Die Faltungsmechanismen verschiedener Proteine werden durch ihre strukturellen und funktionellen Eigenschaften bedingt, so daß kein allgemeingültiger Faltungsverlauf für alle Proteine erkennbar ist.

Neben dem Faltungsmechanismus sind die Prinzipien der Stabilität der Proteine von besonderem Interesse. Der Begriff der Proteinstabilität ist in vielfältiger Weise zu verstehen, so ist zwischen der Stabilität *in vivo* und *in vitro* zu unterscheiden. Während die Stabilität *in vivo* die Halbwertszeit eines Proteins im Organismus beschreibt, versteht man unter der Stabilität *in vitro* die Lagerstabilität des Proteins, die Stabilität gegenüber Proteasen und vor allem die thermodynamische Stabilität des Proteins gegenüber physikalischen Einflüssen und chemischen Denaturierungsmitteln. Die thermodynamische Stabilität wird dabei als der Unterschied der freien Enthalpie zwischen nativem und denaturiertem Zustand des Proteins (ΔG_D) beschrieben. Dieser Unterschied ist für natürlich vorkommende Proteine marginal, er liegt zwischen 20 und 60 kJ/mol (Pace, 1990) und beruht auf der weitgehenden Kompensation zwischen stabilisierenden und destabilisierenden Wechselwirkungen im Protein (Jaenicke, 1991). Die marginale Stabilität von Proteinen hat ihren Ursprung in der Funktion der Proteine. Sie muß zwar groß genug sein, um die native Struktur des Proteins aufrechtzuerhalten, darf aber andererseits nicht die konformationelle Flexibilität der Polypeptidkette einschränken, da diese für die biologische Funktion des Proteins unerlässlich ist (Becktell und Schellmann, 1987).

Generelle Prinzipien zur Stabilisierung von Proteinen sind schwer zu definieren, da die intrinsische Stabilität bereits durch kleine lokale Strukturänderungen beeinflusst wird und damit nie unabhängig von der Primärsequenz des Proteins sowie der ausgebildeten Tertiärstruktur betrachtet werden kann. Die Betrachtung von Proteinen thermophiler Organismen ermöglicht ein Verständnis der Prinzipien von Proteinstabilität. Thermostabile Proteine entsprechender Organismen zeichnen sich durch eine erhöhte Proteolyseresistenz,

eine erhöhte Stabilität gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln, sowie eine erhöhte Rigidität der Polypeptidkette aus. Eine erhöhte Stabilität wird durch die Verringerung der Flexibilität der Polypeptidkette und damit durch eine Verringerung der Konformationsentropie erreicht (Vihinen, 1987; Brock, 1967). Die für die Funktion wichtige Flexibilität wird in diesen Proteinen in bestimmten hochkonservierten Bereichen aufrechterhalten (Vihinen, 1987). Durch den Vergleich homologer Proteine aus mesophilen und thermophilen Organismen können Rückschlüsse auf die Prinzipien der Stabilisierung gezogen werden. Der Vergleich des Kälteschockproteins CspB aus dem mesophilen Organismus *Bacillus subtilis* mit dem thermophilen Homologen Csp aus *Bacillus caldolyticus* ermöglichte die Identifizierung von zwei Positionen, die für die Stabilität des thermostabilen Proteins verantwortlich sind. Die Ursache der Stabilisierung liegt in diesem Fall in einer Optimierung der Oberflächenladungsverteilung (Perl und Schmid, 2001; Martin *et al.*, 2001). Das Verständnis der Prinzipien von Stabilität und Faltung von Proteinen ist für das *protein engineering* von besonderer Bedeutung.

1.2 Einfluß von Disulfidbrücken auf die Proteinstabilität

Neben den für die Tertiärstruktur von Proteinen wichtigen nichtkovalenten Wechselwirkungen tragen Disulfidbrücken als kovalente Bindungen stark zur Stabilität von Proteinen bei und sind vor allem für extrazelluläre Proteine von großer Bedeutung (Thornton, 1981). Disulfidbrücken destabilisieren den ungefalteten Zustand durch eine Entropiereduktion und stabilisieren den nativen Zustand zusätzlich durch günstige lokale Interaktionen mit hydrophoben Aminosäuren (Wedemeyer *et al.*, 2000). Gleichzeitig sind auch enthalpische Effekte am stabilisierenden Effekt beteiligt (Betz, 1993). Die konformationelle Stabilität verschiedener Proteine konnte durch rationales Design erhöht werden, indem zusätzliche Disulfidbrücken durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt wurden (Matsumura *et al.*, 1989; Clarke und Fersht, 1993; Mansfeld *et al.*, 1997). Da Disulfidbrücken jedoch stark konformations- und umgebungsabhängig sind (Bhattacharyya *et al.*, 2004), ist das rationale *engineering* von Disulfidbrücken nur bedingt möglich (Mitchinson und Wells, 1989; Hinck, 1996). Neben der hydrophoben Umgebung der Disulfidbrücken ist die Anordnung von Sauerstoffatomen und aromatischen Ringsystemen für die lokale Struktur in der Umgebung der Disulfidbrücken und damit für deren Stabilität sehr wichtig (Bhattacharyya *et al.*, 2004). Die Spaltung von Disulfidbrücken führt normalerweise zu einem sehr starken Verlust an konformationeller Stabilität von Proteinen (Creighton, 1978; Goto und Hamaguchi, 1982; Goldenberg *et al.*, 1993).

Die Bildung von Disulfidbrücken erschwert außerdem den Faltungsprozeß eines Proteins im eukaryontischen endoplasmatischen Reticulum oder im bakteriellen Periplasma und wird durch ein komplexes System von Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen ermöglicht (Kadokura *et al.*, 2003; Sevier und Kaiser, 2002; Gruber *et al.*, 2006). Im Cytoplasma können aufgrund des reduzierenden Milieus keine Disulfidbrücken ausgebildet werden, so daß cytoplasmatisch wirksame Proteine ohne Disulfidbrücken stabil gefaltet vorliegen müssen. Dies ist für

intrazelluläre Wirkstoffe von besonderer Bedeutung. Disulfidfreie Antikörper konnten beispielsweise sowohl durch gerichtete Evolution als auch durch Sequenzoptimierung generiert werden (Wirtz und Steipe, 1999; Steipe *et al.*, 1994; Proba *et al.*, 1998).

1.3 Bedeutung der Stabilisierung von Enzymen für die Biotechnologie

Die Bedeutung von Enzymen in der Industrie hat in den letzten Jahren stark zugenommen, etwa 500 kommerzielle Produkte werden unter Verwendung von Enzymen synthetisiert (Johannes und Zhao, 2006). Die meisten industriell verwendeten Enzyme besitzen Hydrolyseaktivität und werden in der Textil-, Papier-, Leder- und Kosmetikindustrie verwendet (65 %). Nur etwa 25 % der Enzyme werden für die Nahrungsmittelindustrie verwendet, etwa 10 % für die Futtermittelproduktion (Cherry und Fidantsef, 2003). Gegenüber chemischen Katalysatoren haben Enzyme den Vorteil, daß sie eine sehr hohe Selektivität besitzen und gleichzeitig unter relativ moderaten Bedingungen (Temperatur, Druck, pH) arbeiten. Natürlich vorkommende Enzyme haben jedoch selten genau die gewünschten Eigenschaften für den entsprechenden Prozeß. Aktivität, Selektivität, Stabilität, Löslichkeit etc. müssen also erst dem gewünschten Prozeß angepaßt werden (Johannes und Zhao, 2006). Für das *engineering* entsprechender Enzyme werden verschiedene Ansätze verfolgt, die unter 1.4 genauer erläutert werden.

Viele industrielle Anwendungen erfordern thermostabile Enzyme, die auch bei hoher Temperatur Aktivität besitzen. Durch gerichtete Evolution konnte die thermodynamische Stabilität einiger Enzyme drastisch erhöht werden. Xylanase konnte auf diese Weise um 35 °C stabilisiert werden (Palackal *et al.*, 2004), Pectat-Lyase um 16 °C (Solbak *et al.*, 2005). Die Modifikation von Enzymen in biosynthetischen Stoffwechselwegen gewinnt zunehmend an Bedeutung. Dabei muß nicht das isolierte Enzym optimiert, sondern eine Verbesserung eines Enzyms im Kontext des zellulären Metabolismus erreicht werden. Erste Erfolge zur gerichteten Evolution in Multi-Enzymkomplexen und Stoffwechselwegen konnten bereits erzielt werden (Chatterjee und Yuan, 2006).

1.4 Ansätze zur Stabilisierung von Proteinen

Natürlich vorkommende Proteine und Enzyme sind durch die Evolution in ihren Eigenschaften an die sehr milden Bedingungen in der lebenden Zelle angepaßt. Spezifität, Stabilität und Aktivität sind daher in der Regel für biotechnologische Prozesse schlecht geeignet (Fernandez-Gacio *et al.*, 2003). Die für eine optimale Anwendbarkeit erforderlichen Modifikationen der Eigenschaften von Proteinen können auf verschiedene Weise erreicht werden.

Eine Strategie ist die ortsgerichtete Mutagenese, wobei gezielt einzelne Reste im Protein mutiert werden. Entsprechende Ansätze des rationalen Designs sind im Zusammenhang mit Strukturinformationen möglich und konnten erfolgreich zum Design von Enzymen mit veränderten Eigenschaften angewendet werden (Cedrone *et al.*, 2000; Brik *et al.*, 2002). Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, daß die bisherigen Kenntnisse der Struktur-Funktions-

Beziehungen zu begrenzt sind, um den Erfolg solcher rationaler Ansätze gewährleisten zu können (Rubingh, 1997, Kast und Hilvert, 1997).

Eine alternative Strategie stellt die gerichtete Evolution zur Untersuchung von Sequenz-Stabilitäts-Zusammenhängen dar (Arnold und Volkov, 1999; Tobin et al., 2000). In diesem Fall werden Bibliotheken von Mutanten erstellt, und Varianten des entsprechenden Proteins mit der gewünschten Eigenschaft werden dann durch *Screening* oder Selektion identifiziert (Fernandez-Gacio *et al.*, 2003). Der Erfolg dieser Strategie hängt einerseits von der Größe, der Qualität und der Diversität der Bibliotheken und andererseits von der Selektivität des *Screening*- bzw. Selektionssystems ab.

Beim *Screening* müssen einzelne Klone untersucht werden, um die Eigenschaften der exprimierten Proteinvariante zu analysieren. Ein erfolgreiches *Screening* ist damit von vielen Komponenten (Konzentration und spezifische Aktivität des Enzyms, Sensitivität des Testsystems, mögliche Wechselwirkung mit anderen Enzymen etc.) abhängig. Bei der Selektion wird diese Problematik der Identifikation von Klonen mit der gewünschten Eigenschaft umgangen, da nur solche Klone überleben, die ein bestimmtes Maß der entsprechenden Aktivität aufweisen. Im Gegensatz zum *Screening*, welches in der Bibliotheksgröße auf einige tausend Varianten beschränkt ist, können mit guten Selektionsmethoden optimierte Varianten in Bibliotheken mit $\geq 10^7$ Varianten identifiziert werden.

Bei den Selektionsmethoden unterscheidet man zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Selektion. *In vivo*-Selektionen verknüpfen die Überlebensrate eines Organismus mit der Funktion des zu optimierenden Proteins und sind daher immer nur dann anwendbar, wenn das betrachtete Protein dem Organismus einen biologischen Vorteil verleiht. Matsumura und Aiba konnten auf diese Weise die Thermostabilität eines Enzyms durch Expression in einem thermophilen Organismus erhöhen (Matsumura und Aiba, 1985). Die *in vitro*-Selektion erfordert die Verknüpfung des Proteins mit der codierenden Nukleinsäure. Diese Kopplung stellt die größte Herausforderung im Vergleich zur Selektion von DNA und RNA dar.

Neben diesen experimentellen Ansätzen ist das rechnergestützte Design von Proteinen auf der Grundlage der Erkenntnisse aus den experimentellen Daten eine besondere Herausforderung. Es hat erst in den letzten Jahren zu bemerkenswerten Erfolgen geführt. So konnten Proteine mittels rechnergestützter Designstudien stabilisiert werden (Dantas *et al.*, 2003) oder Bindungseigenschaften von Proteinen verändert werden (Looger *et al.*, 2003). Die Thermostabilität von Cytosin-Desaminase aus Hefe wurde mittels *Computational Design* erhöht, wobei gleichzeitig die Wildtyp-Aktivität aufrechterhalten werden konnte (Korkegian *et al.*, 2005). *Computational Design* und evolutive Verfahren sind nicht unabhängig voneinander zu bewerten, sie ergänzen sich vielmehr. Während rechnergestützte Ansätze die Identifikation von Positionen ermöglichen und damit die Bibliotheksgrößen für die gerichtete Evolution einschränken, ermöglicht der experimentelle Ansatz die Identifikation der am stärksten stabilisierenden Aminosäuren an diesen Positionen (Malakauskas und Mayo, 1998; Wunderlich *et al.*, 2005).

1.5 *In vitro*-Evolution

Unter den *in vitro*-Selektionsmethoden für Proteine nehmen die Display-Verfahren die bedeutendste Rolle ein. Man unterscheidet dabei Displaymethoden an der bakteriellen Oberfläche vom sogenannten *phage display* (Fernández, 2004; Castagnoli *et al.*, 2001; Samuelson *et al.*, 2002). Bei letzterem werden Bibliotheken von Nukleotidsequenzen des zu evolvierenden Proteins in ein Hüllprotein eines filamentösen Phagen inseriert (Smith, 1985). Die entsprechenden Proteine werden dann auf der Oberfläche der filamentösen Phagen präsentiert und entsprechend der zu optimierenden Eigenschaft selektiert.

1.5.1 Varianten des *phage display*

Als Vektoren für das *phage display* werden meist die filamentösen Phagen M13, fd und verwandte Phagemide verwendet (Fernandez-Gacio *et al.*, 2003). Filamentöse Phagen infizieren F-Pilus-tragende *E. coli*-Stämme, ohne diese zu lysieren. Sie bestehen aus einer einzelsträngigen DNA, die von einer Hülle aus insgesamt fünf verschiedenen Proteinen umgeben ist. Das Haupthüllprotein ist das Gen-8-Protein (G8P), welches das Capsid bildet. Es besteht aus 50 Aminosäuren; die Kopienzahl hängt von der Größe der verpackten DNA ab. Weitere Hüllproteine sind auf einer Seite des Capsids das Gen-7-Protein und das Gen-9-Protein, auf der anderen Seite das Gen-6- und das Gen-3-Protein (G3P). Das G3P liegt in drei bis fünf Kopien vor und ist für die Infektiosität des Phagen verantwortlich. Alle fünf Hüllproteine wurden bereits für Display-Verfahren verwendet. Die meisten Bibliotheken werden jedoch durch Fusion mit dem N-Terminus des G8P oder des G3P erstellt.

G3P und G8P unterscheiden sich deutlich in ihrer Kopienzahl. Proteine werden bevorzugt als G3P-Fusion in den Phagen eingebaut, da G8P-Fusionen in dieser Größe problematisch sind. Peptid- und Protein-Fusionen an den N-Terminus von G7P (Gao *et al.*, 1999) und G9P (Gao *et al.*, 2002) sind ebenso möglich wie Fusionen an den C-Terminus von G6P (Hufton *et al.*, 1999), G8P (Weiss und Sidhu, 2000) und G3P (Fuh und Sidhu, 2000). cDNA-Bibliotheken können über C-terminale Fusionen an G6P (Jespersen *et al.*, 1995), G3P (Sidhu, 2001) oder den Leucin-Zipper Fos (Cramer *et al.*, 1993; Brunet *et al.*, 2002) auf der Phagenoberfläche präsentiert werden.

Das Gastprotein liegt in allen Fällen exponiert im Periplasma vor, da alle Hüllproteine vor dem Zusammenbau des Phagen in der inneren Membran der Wirtszelle verankert sind. Dies ermöglicht die Ausbildung von Disulfidbrücken in Peptid- und Proteinbibliotheken. Die verschiedenen Arten des *phage display* sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Neben dem Einbau des Gastproteins als Fusionsprotein im Phagen genom (Abbildung 1.1 A) kann auch ein Phagemid zur Erstellung der Bibliothek genutzt werden (Abbildung 1.1 C). Hierbei wird das Gastprotein als Fusionsprotein des G3P auf einem Plasmid in die Zelle eingebracht. Das Plasmid enthält eine Antibiotikumresistenz als Marker, bakterielle und Phagen-*origins of replication* und ein Verpackungssignal des Phagen. Die Phagemid-DNA wird dann zur Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Um das Display der Peptid- bzw.

Proteinvarianten auf der Phagenoberfläche zu ermöglichen, werden die Phagemid-tragenden Bakterien mit Helfer-Phagen infiziert, welche die Informationen für die Phagenhüllproteine enthalten. Helfer-Phagen besitzen meist ein defektes Verpackungssignal, so daß nur die Phagemid-DNA von den Hüllproteinen umschlossen wird. Die zugehörigen Phagen besitzen dann verschiedene Varianten des G3P: zum einen das Wildtyp-Protein, das vom Helfer-Phagen codiert wird, zum anderen die Variante des Fusionsproteins aus der Bibliothek des Phagemids (Kehoe und Kay, 2005). Helfer-Phagen können den Erfordernissen der Selektion angepaßt werden und daher unterschiedlich aufgebaut sein. So können beispielsweise die N1- und die N2-Domäne des G3P deletiert werden, so daß der Helfer-Phage nur noch die CT-Domäne des G3P enthält (Kramer *et al.*, 2003). In diesem Fall können nur Phagen mit Fusionsprotein propagiert werden.

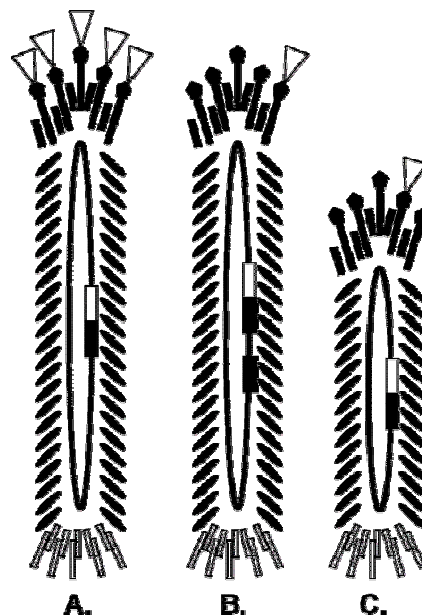


Abbildung 1.1: Verschiedene Arten des *phage display*. A. Phagensysteme. Das zu optimierende Protein wird als G3P-Fusionsprotein exprimiert. B. Hybridsysteme. Das Phagen genom enthält zwei Kopien des G3P, eines mit Fusionspartner, eine Kopie ohne. Das Wildtyp-Protein wird in größeren Mengen exprimiert. C. Phagemidsysteme. Das Virion enthält nur das Phagemid, welches die Fusionsbibliothek codiert. Durch Infektion mit einem Helferphagen wird die Expression der Phagenproteine sichergestellt. Gezeigt ist die Phagen-DNA umgeben von der Proteinhülle des Phagen, wobei das G3P in schwarz und das zu optimierende Protein in weiß (▽) dargestellt ist. (Die Abbildung ist der Publikation von Kehoe und Kay (2005) entnommen.)

Eine weitere Möglichkeit zur Konstruktion der Bibliotheken sind Hybridsysteme (Abbildung 1.1 B) zwischen dem Wildtyp-Hüllprotein und einer weiteren Kopie dieses Proteins unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors und mit einer *multiple cloning site* im Phagen genom. Gastproteine können hier als N-terminale Fusion des Hüllproteins, meist G8P, eingebaut und exprimiert werden (Zwick *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Bonnycastle *et al.*, 1996).

Der Export des Fusionsproteins zwischen G3P und Gastprotein erfolgt über den Sec-Transportweg, wobei das Fusionsprotein mittels der CT-Domäne des G3P in der Periplasma-Membran verankert bleibt (Davis *et al.*, 1985; Endemann und Model, 1995). Der Sec-abhängige Transport ist nicht für alle Proteine geeignet, da die ungefaltete Polypeptidkette ins

Periplasma transportiert wird und dort in die native Konformation falten muß. Paschke und Höhne haben 2005 deshalb ein *phage display*-System entwickelt, bei dem das Fusionsprotein über den Tat-Transportweg (*twin arginine translocation*) gefaltet exportiert wird (Paschke und Höhne, 2005). Protein-Transport über den Tat-Transportweg ist jedoch langsamer und energetisch aufwendiger (Paschke, 2006). Die Wahl des geeigneten Display- und Exportsystems ist damit von dem zu evolvierenden Protein abhängig.

1.5.2 Anwendungen des *phage display*

Das *phage display* hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Während die ersten Anwendungen vor allem auf die Identifikation von Bindungsproteinen mit hoher Affinität abzielten, gewinnen Selektionen auf eine erhöhte Stabilität und zahlreiche andere Anwendungen immer mehr an Bedeutung.

1.5.2.1 *Phage display*

Im traditionellen *phage display* wird die Phagenbibliothek mit einem für das zu optimierende Protein spezifischen Liganden inkubiert, der an einer Matrix immobilisiert vorliegt. Eine Bindung des Phagen an die Matrix ist nur bei einer korrekten dreidimensionalen Struktur des auf dem Phagen präsentierten Gastproteins möglich. Dabei muß in diesem Fall ein Ligand des untersuchten Proteins bekannt sein. Im Gegensatz dazu ermöglicht das *phage display* über ein System aus zwei bekannten interagierenden Komponenten eine Selektion ohne einen solchen Liganden (Chakravarty *et al.*, 2000). *Phage display* wird meist zur Entwicklung von Affinitätsreagentien angewendet, wobei häufig Immunglobulin-Fragmente verwendet werden (Bradbury und Marks, 2004). Da IgGs von eukaryontischen Zellen produziert werden, ist ihre Expression in Bakterien problematisch (Simmons *et al.*, 2002). Deshalb werden bevorzugt *single-chain*-Fragmente der variablen Regionen (scFvs) (Sheets *et al.*, 1998) und Antigen-bindende Fragmente (Fabs) (de Haard *et al.*, 1999) anstelle dessen verwendet. Als sogenannte *alternative scaffolds* für die Entwicklung von Bindungsproteinen kommen unter anderem Affibodies (Hansson *et al.*, 1999), Lipocaline (Beste *et al.*, 1999), Fibronectin-TypIII-Domänen (Koide *et al.*, 1998), β -Lactamase (Legendre *et al.*, 2002), Zinkfinger-Domänen (Bianchi *et al.*, 1995) und Ankyrin Repeats (Binz *et al.*, 2004; Forrer *et al.*, 2003) zum Einsatz. Voraussetzung für die Verwendung eines Proteins als *scaffold*-Protein für die Evolution von Bindungsmodulen ist das Vorhandensein lösungsmittelzugänglicher Loops oder Bereiche zugänglicher Reste, die eine Veränderung ohne Beeinträchtigung von Struktur und Stabilität des Proteins erlauben (Smith, 1998). Es muß sich auf der Phagenhülle präsentieren lassen und in Bakterien gut exprimiert werden.

Man unterscheidet beim *phage display* die indirekte Selektion mit Inhibitoren von der direkten Selektion mit Substraten. Da Übergangszustandsanaloga die Geometrie und Ladungsverteilung des Übergangszustands widerspiegeln und die katalytische Aktivität der Enzyme durch die höhere Affinität zum Übergangszustandsanalogon geprägt ist, sollte die Selektion mit diesen Inhibitoren effektiver sein. Der Erfolg dieser indirekten Methode hängt

jedoch von den strukturellen Änderungen zwischen Substratbindung und Übergangszustand ab. Ferner sind solche Inhibitoren nicht für alle Enzymklassen vorhanden. Aufgrund dieser Einschränkungen sind direkte Methoden gefragt, wobei häufig Enzym und Substrat gleichzeitig auf der Phagenoberfläche präsentiert werden. Die Selektion erfolgt in diesem Fall durch eine produktbindende Matrix (Fernandez-Gacio, 2003; Demartis *et al.*, 1999; Heinis *et al.*, 2001).

Das *phage display* findet in der Biotechnologie vielfältige Anwendung, z.B. zur Selektion von Peptiden, die an anorganische Materialien und Nanopartikel binden (Kehoe und Kay, 2005), zur Identifikation von Substraten von Proteasen (Deperthes, 2002) und zur Selektion von Proteinen mit bestimmter Aktivität (Atwell, 1999).

1.5.2.2 Selectively infective phage (SIP)

Eine Abwandlung des *phage display* ist die Methode des *selectively infective phage* (SIP), wobei die Wechselwirkung von Protein und Ligand direkt mit der Infektiosität des Phagen verknüpft wird. Dabei wird die Infektiosität des Phagen durch Eliminierung entweder der N1-Domäne (Armstrong *et al.*, 1981; Stengele *et al.*, 1990) oder des N1N2-Fragments des Phagen-G3P zerstört (Krebber *et al.*, 1997). Die Bibliothek des zu evolvierenden Peptids oder Proteins wird als N-terminales Fusionsprotein des modifizierten Phagen-G3P auf der Phagenhülle präsentiert. Der zugehörige Ligand wird an die N1-Domäne des G3P bzw. an das deletierte N1N2-Fragment gekoppelt. Nur wenn eine Bindung des Fusionsproteins an den Liganden erfolgt, kann der zugehörige Phage eine Bakterienzelle infizieren (Jung *et al.*, 1999). Das SIP umgeht die unspezifische Bindung von Phagen an die Affinitätsmatrix, welche im *phage display* zur Identifikation falsch-positiver Klone führt (Adey *et al.*, 1995). Im *in vitro*-SIP werden die Komponenten einzeln gereinigt (Phage mit Fusionsprotein und Ligand-N1(N2)-Fusionsprotein) und dann in definierten Mengen zusammengegeben. Im *in vivo*-SIP wird der Ligand genetisch mit N1 bzw. N1N2 fusioniert und ebenfalls im Phagengenom codiert. Der Ligand wird ins bakterielle Periplasma exportiert, die CT-fusionierte Proteinbibliothek bleibt mit der inneren Membran der Wirtszelle verbunden. Nur bei einer Interaktion von Protein und Ligand im Periplasma kann ein infektiöser Phage entstehen.

1.5.2.3 Selektion auf erhöhte thermodynamische Stabilität eines Proteins: Proside

Eine Selektion thermodynamisch stabilisierter Proteinvarianten kann ebenfalls durch abgewandelte *phage display*-Systeme erreicht werden. Dazu wurden bislang vor allem zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

Proside (protein stability increased by directed evolution) (Sieber *et al.*, 1998) ist ein auf dem SIP basierendes Selektionssystem, in dem eine erhöhte Proteaseresistenz stabilisierter Proteinvarianten mit der Infektiosität filamentöser Phagen verknüpft wird. Eine Bibliothek des zu stabilisierenden Gastproteins wird zwischen der N2- und der CT-Domäne des Phagen-G3P eingebaut. Die resultierende Phagenbibliothek enthält dann Fusionsproteine zwischen

G3P und dem Gastprotein (P), die an der Phagenoberfläche präsentiert werden (Abbildung 1.2). Die Phagenbibliothek wird in einem *in vitro*-Schritt mit einer Protease inkubiert. Unter den gewählten Bedingungen instabile Gastproteinvarianten liegen ungefaltet vor, sind für die Protease somit zugänglich und können von dieser geschnitten werden (P1, P2). Die zugehörigen Phagen verlieren ihre Infektiosität. Nur wenn die drei Domänen des G3P erhalten bleiben, d.h. wenn das Gastprotein resistent gegenüber Proteolyse ist (Variante P3), bleibt der Phage infektiös und kann in wiederholten Zyklen von *in vitro*-Selektion, Infektion von *E. coli* und Phagenpropagation angereichert werden. Die Funktionsweise des *Proside*-Selektionssystems ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

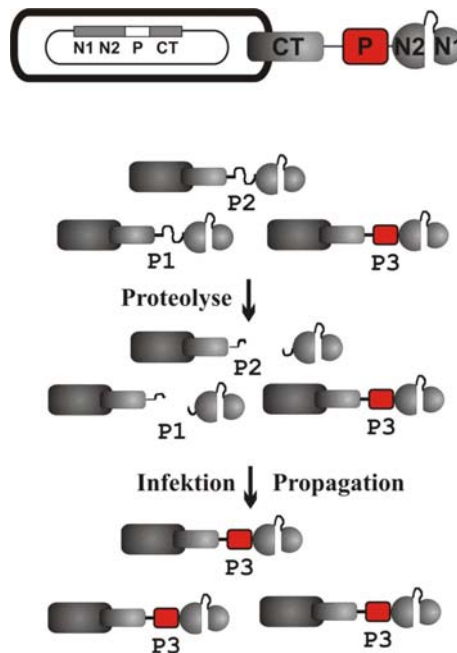


Abbildung 1.2: *Proside*-Selektionssystem für stabilisierte Proteinvarianten (nach Sieber *et al.*, 1998, verändert).

Das *Proside*-Selektionssystem ist wie SIP unabhängig von einer Affinitätsmatrix. Limitiert wird das System durch die thermodynamische Stabilität des Wildtyp-G3P. Durch Zufallsmutagenese konnte das G3P jedoch stark stabilisiert werden, so daß die zugehörigen Phagen bis etwa 60 °C proteasestabil sind (Martin und Schmid, 2003b). Mit dem *Proside*-System konnten für das Kälteschockprotein CspB aus *Bacillus subtilis* (Martin *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002; Wunderlich *et al.*, 2005) und die β -Domäne des Streptococcen-Proteins G enorme Stabilisierungen erzielt werden (Wunderlich *et al.*, 2005b; Wunderlich und Schmid, 2006). Kristensen und Winter konnten das gleiche Selektionsprinzip auf die Barnase anwenden. Aus einer Mischung von Barnase-Mutanten unterschiedlicher Stabilität eingebaut als Fusionsprotein zwischen N2- und CT-Domäne des G3P konnte durch wiederholte Zyklen von Proteolyse, Infektion und Propagation die stabilere stark angereichert werden (Kristensen und Winter, 1998).

Einen anderen Ansatz zur evolutiven Stabilisierung verfolgten Finuncane *et al.* (1999). Die Gastproteinbibliothek wurde in diesem Fall N-terminal an die N1-Domäne des G3P fusioniert

und mit einem His-Tag versehen. Auch in diesem Fall wurde eine Proteolyse der Phagenbibliothek durchgeführt. Die Kopplung von erhöhter Proteaseresistenz und Infektiosität ist in diesem Fall jedoch nicht gegeben, stattdessen erfolgt die Selektion durch einen Affinitätsschritt an einer Ni-NTA-Matrix.

Um die Stabilität von Proteinen bzw. Enzymen unter gleichzeitigem Erhalt ihrer Aktivität zu erreichen, ist eine kombinierte Selektion auf Stabilität und Aktivität erforderlich (Dalby *et al.*, 2000). Eine Erhöhung der Stabilität geht häufig mit einem Verlust an Aktivität bei niedriger Temperatur einher. *In vitro*-Evolution und *protein engineering* konnten jedoch zeigen, daß dies nicht immer der Fall sein muß (Miyazaki und Arnold, 1999; Gershenson und Arnold, 2000).

1.5.3 Vollständig *in vitro* ablaufende Selektionen

Alle *phage display*-Systeme sind neben dem *in vitro*-Selektionsschritt auch einer *in vivo*-Selektion unterworfen. Bakterienzellen, die toxische Proteine oder schlecht exportierbare Proteine exprimieren, können im Laufe der Selektion verloren gehen. Ferner kann das präsentierte Protein die Infektiosität des Phagen beeinflussen, wenn es in vielen Kopien vorliegt (vor allem bei Fusionen mit dem G8P). Dieses Problem kann durch das Abtrennen des Gastproteins vor der Infektion der Bakterienzelle umgangen werden (Fernandez-Gacio, 2003). Um diese *in vivo*-Selektion zu unterdrücken, wurden vollständig *in vitro* ablaufende Selektionssysteme entwickelt.

Im Ribosomen-Display (Hanes und Plückthun, 1997) können Bibliotheken von nativen Proteinen in einem zellfreien System evolviert und damit unabhängig vom zellulären Milieu betrachtet werden. Es wird eine DNA-Bibliothek erstellt, die transkribiert und *in vitro* translatiert wird. Das gefaltete Protein und die zugehörige codierende DNA bleiben mit dem Ribosom verbunden, und die Selektion erfolgt durch Ligandenbindung an einer Affinitätsmatrix.

Beim mRNA-Display werden Polypeptidkette und codierende mRNA kovalent miteinander verknüpft, indem synthetische mRNAs, die mit Puromycin verknüpft sind, *in vitro* translatiert werden (FitzGerald, 2000). Bei der *in vitro*-Translation erreichen die Ribosomen die Verknüpfungsstelle zwischen mRNA und DNA-Linker. Nun kann Puromycin in die ribosomale A-Stelle eintreten und die Bildung einer stabilen Amidbindung mit dem codierten Peptid herbeiführen.

1.6 Filamentöse Phagen – Aufbau und Infektion

Wie bereits erwähnt, bestehen Phagen aus ihrer DNA umgeben von einer Proteinhülle aus G8P. G3P ist für die Infektion verantwortlich. Es bindet zu Beginn des Infektionszyklus an den F-Pilus von *E. coli*. Die stabile Interaktion zwischen den drei Domänen des G3P wird bei der Infektion der Wirtszelle durch die Wechselwirkungen mit den zellulären Rezeptoren geschwächt (Chatellier, 1999). Der erste Schritt des Infektionszyklus ist die Pilusbindung, an der nur die N2-Domäne des G3P beteiligt ist (Deng und Perham, 1999). Die

Pilusbindungsstelle ist auf der Außenseite der Domäne lokalisiert (Deng und Perham, 2002), und nach der Bindung des Phagen wird der Pilus durch einen bislang unbekannten Mechanismus zurückgezogen (Jacobson, 1972). Erreicht der Phage die Oberfläche der bakteriellen Wirtszelle, so kann die N1-Domäne des G3P an den bakteriellen Rezeptor, die C-terminale Domäne des Membranproteins TolA, binden (Riechmann und Holliger, 1997; Lubkowski *et al.*, 1999). Durch die Bindung von N2 an den F-Pilus und die damit verbundene Domänenöffnung wird die TolA-Bindungsstelle der N1-Domäne an der Domänengrenzfläche zugänglich (Click und Webster, 1997), da die N1-Domäne überlappende Bindungsstellen für N2 und TolA besitzt. Die bakteriellen Tol-Proteine bilden einen Komplex in der inneren Membran der *E. coli*-Zelle (Derouiche *et al.*, 1996), und die nicht in der Membran verankerten Bereiche dieses TolQRA-Komplexes durchspannen den periplasmatischen Raum (Levengood *et al.*, 1991). TolQRA ist für die Translokation der Phagen-DNA in das Cytoplasma und die Translokation der Phagenproteine in die Cytoplasmamembran verantwortlich (Russel *et al.*, 1988, Click und Webster, 1998). Der für die Infektion notwendige geöffnete Zustand des N1N2-Fragments wird durch einen Prolin-Schalter reguliert (Eckert *et al.*, 2005; Martin und Schmid, 2003c), und die Bindung der N1-Domäne an TolA führt außerdem zu einer Konformationsänderung in der C-terminalen Domäne des G3P, wodurch die Phagenhülle geöffnet wird (Bennett und Rakonjac, 2006).

Der Phage kann seine DNA in die Bakterienzelle entlassen, die Hüllproteine werden in die innere Bakterienmembran inseriert (Nakamura *et al.*, 2003). In der Bakterienzelle wird die einzelsträngige Phagen-DNA mittels bakterieller Enzyme in doppelsträngige DNA überführt. Nun beginnen die Synthese der elf Phagenproteine und die *rolling circle*-Replikation des Phagen-genoms. Die Hüllproteine G8P, G7P, G9P, G6P und G3P lagern sich spontan in die innere Bakterienmembran ein (Barbas *et al.*, 2001). Ist die Konzentration an G5P hoch genug, umhüllt es die neusynthetisierte einzelsträngige Phagen-DNA und verhindert damit die Umwandlung in die doppelsträngige Form (Konings *et al.*, 1995; Guan *et al.*, 1995). Nur ein kleiner Bereich der ssDNA, der eine Hairpin-Struktur bildet, wird vom G5P ausgespart und dient als Verpackungssignal. Dieser Hairpin-Bereich wird von einem Komplex aus G4P, G11P und G1P erkannt (Opalka *et al.*, 2003; Marciano *et al.*, 1999). Das Virion wird assembliert und gleichzeitig durch diesen porenbildenden Komplex ausgeschleust (Barbas *et al.*, 2001), das G5P wird verdrängt und durch G8P ersetzt (Feng *et al.*, 1997). Durchschnittlich jeweils fünf Kopien von G7P und G9P sind auf der Seite des Verpackungssignals an der Phagenspitze lokalisiert. Sie sind an der Initiation der Assemblierung beteiligt. Wenn das Virion die Wirtszelle verläßt, werden jeweils etwa fünf Kopien von G3P und G6P in die Hülle eingebaut; G3P ist an der Freisetzung des Phagenpartikels aus dem Bakterium und damit am Verlassen der Wirtszellmembran beteiligt (Rakonjac und Model, 1998). Die Wirtszelle wird dabei nicht lysiert, sondern teilt sich weiterhin, allerdings nur mit halber Teilungsrate im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen (Barbas *et al.*, 2001).

1.7 Struktur und Funktion des Gen-3-Proteins (G3P) filamentöser Phagen

Das Gen-3-Protein (G3P) filamentöser Phagen ist, wie in 1.6 ausführlich beschrieben, als ein Hüllprotein der Ff-Phagen (M13, f1 und fd) (Webster, 1996; Marvin, 1998) in drei bis fünf Kopien an einer Spitze des Phagen lokalisiert (Model und Russel, 1988). Es besteht aus drei Domänen, N1, N2 und CT, mit insgesamt 406 Aminosäuren, die durch glycinreiche Tetra- und Pentapeptidwiederholungen miteinander verbunden sind (Stengele *et al.*, 1990; Kremser und Rasched, 1994). Die N1-Domäne besteht aus 68 Aminosäuren, N2 umfaßt 131 Aminosäuren, und die CT-Domäne ist aus 150 Aminosäuren aufgebaut. Das G3P wird als Vorläuferprotein aus 424 Aminosäuren synthetisiert, wobei die 18 Aminosäuren umfassende Signalsequenz beim Export ins Periplasma abgespalten wird.

Die CT-Domäne durchspannt die innere Membran, die carboxyterminalen fünf Aminosäuren sind im Cytoplasma lokalisiert. Sie dient der Verankerung des G3P in der inneren Membran der Wirtszelle (Davis *et al.*, 1995) und ist für die Freisetzung der Phagenpartikel aus der Wirtszelle essentiell (Rakonjac und Model, 1999; Rakonjac *et al.*, 1999). Das N1N2-Fragment ist für die Infektiosität verantwortlich.

Die Struktur des N1N2-Fragments konnte sowohl durch Kristallstrukturanalyse als auch mittels NMR gelöst werden (Riechmann und Holliger, 1997; Lubkowski *et al.*, 1998; Holliger *et al.*, 1999) und ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die CT-Domäne ist sehr hydrophob und konnte bislang nicht kristallisiert werden. Die beiden N-terminalen Domänen bilden eine hufeisenförmige Struktur, die unter bestimmten Bedingungen als knopfartige Struktur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Phagen sichtbar ist (Gray *et al.*, 1981).

Das N1N2-Fragment besteht hauptsächlich aus β -Faltblattsträngen und einer kurzen α -Helix in jeder Domäne. N1 besteht aus einer N-terminalen Helix gefolgt von fünf β -Strängen, die eine faßartige Struktur bilden und zusammen mit den zwei β -Strängen der Gelenkregion Teil eines siebensträngigen Faltblatts sind. Die N1-Domäne enthält zwei Disulfidbrücken, eine zwischen Cys7 und Cys36 und eine zwischen Cys46 und Cys53. In der N2-Domäne ist eine dritte Disulfidbrücke zwischen Cys188 und Cys201 vorhanden. Der glycinreiche *Linker* ist in der Kristallstruktur wegen seiner hohen Flexibilität nicht aufgelöst. Die größere N2-Domäne besteht aus acht β -Strängen, von denen sechs ein gemischtes β -Faltblatt bilden. Der erste und der letzte β -Strang sind am β -Faltblatt der N1-Domäne beteiligt (Lubkowski *et al.*, 1998). Die N2-Domäne enthält außerdem zwei *cis*-Proline, Pro161 und Pro213. Pro213 in der Gelenkregion ist für die Infektion der Wirtszelle wichtig. Die *cis/trans*-Isomerisierung dieses Prolins dient als Schalter zwischen der geöffneten, TolA-zugänglichen Form und der domänenassoziierten Form des G3P (Eckert *et al.*, 2005).

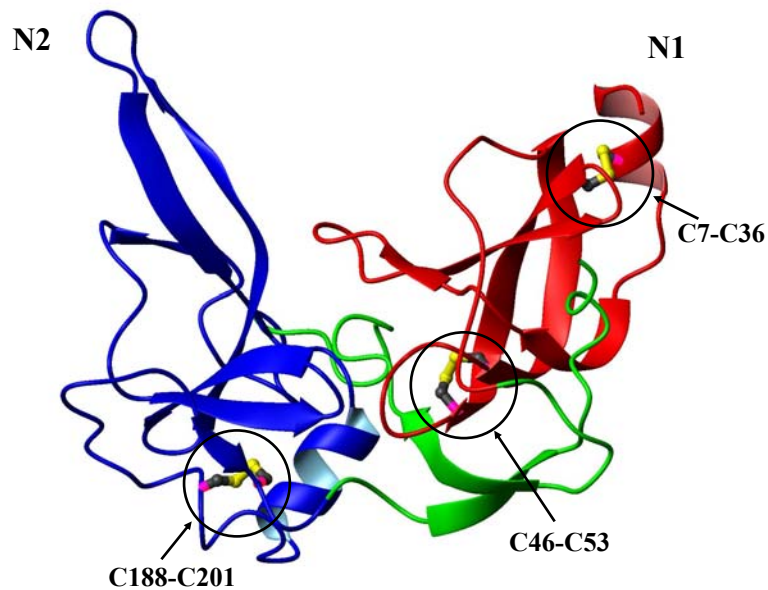


Abbildung 1.3: Struktur des N1N2-Fragments des Gen-3-Proteins filamentöser Phagen. Die N1-Domäne ist in rot, die N2-Domäne in blau und die Gelenk-Subdomäne der N2-Domäne in grün dargestellt. Die Seitenketten der Cysteine sind im Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol erstellt und basiert auf den Kristallstrukturdaten des G3P N1N2-Fragments (Holliger *et al.*, 1999; *pdb-file* 2g3p).

Die Domänengrenzfläche zwischen N1 und N2 besteht hauptsächlich aus hydrophoben Resten, die einzigen geladenen Aminosäuren in der N1-Domäne sind zwischen Lys22 und Arg29 lokalisiert. N2 besitzt ausschließlich hydrophobe Reste an der Domänengrenze, und nur wenige Reste sind an Domänenwechselwirkungen beteiligt (Lubkowski *et al.*, 1998).

1.8 TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli*

1.8.1 β -Lactamasen: Klassifizierung, Struktur und Mechanismus

Neben der Optimierung des G3P selbst, sollte TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli* mit der Proside-Methode stabilisiert werden.

β -Lactame inhibieren die membrangebundenen Transpeptidasen, die in der bakteriellen Zellwandsynthese eine wichtige Rolle bei der Quervernetzung der Peptidoglycanketten spielen. Transpeptidasen werden deshalb häufig als „penicillin binding proteins“ oder PBPs bezeichnet. β -Lactam-Antibiotika ähneln dem D-Ala-D-Ala-Substrat (Peptidylrest an N-Acetylglucosamin) der Transpeptidasen und binden anstelle des Substrats, so daß die Transpeptidierung behindert wird. Die Folge ist ein schwach vernetztes Peptidoglycangerüst, wodurch die Bakterien anfällig für Zellyse werden (Ghuysen *et al.*, 1996; Wilke *et al.*, 2005).

β -Lactamasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse der Amidbindung des β -Lactam-Rings von Penicillinen, Cephalosporinen und verwandten Verbindungen spalten. Sie verleihen ihrer Wirtszelle damit Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum. β -Lactamasen sind vor allem in

Gram-negativen Bakterien wichtig; sie stellen den wichtigsten Schutz gegen β -Lactam-Antibiotika dar. Da β -Lactamasen sowohl auf dem Chromosom als auch auf Plasmiden und Transposons codiert sind, können sie leicht durch diese mobilen genetischen Elemente unter den verschiedenen Bakterien verbreitet werden (horizontaler Gentransfer) (Wilke *et al.*, 2005; Davies, 1994). Nach der Expression werden β -Lactamasen in Gram-negativen Bakterien in das Periplasma sekretiert bzw. in Gram-positiven Bakterien an die Cytoplasmamembran gebunden oder sekretiert.

Gemäß ihrer Primärsequenz werden die über 470 bekannten β -Lactamasen in vier Klassen eingeteilt (Klassen A-D) (Vanhove *et al.*, 1995; Ambler, 1980). Für Vertreter jeder der vier Klassen konnten mittlerweile Kristallstrukturen gelöst werden (Fisher *et al.*, 2005).

β -Lactamasen der Klassen A, C und D besitzen eine ähnliche Struktur und einen ähnlichen Mechanismus. Durch Deprotonierung wird ein Serin-Nukleophil im aktiven Zentrum gebildet, das den β -Lactamring angreift und zur Entstehung eines Acyl-Enzym-Intermediats führt. Das Intermediat wird durch ein mittels einer Base aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert. Diese Serin- β -Lactamasen unterscheiden sich nur in der Base für Acylierung und Deacylierung (Wilke *et al.*, 2005). Klasse B- β -Lactamasen sind Zink-Metallo- β -Lactamasen, die sich in Sequenz, Faltung und Mechanismus komplett von den Serin- β -Lactamasen unterscheiden. Es gibt drei Unterklassen, B1-B3, der Metallo- β -Lactamasen. Enzyme der Klassen B1 und B3 können ein oder zwei Zinkionen binden (Heinz und Adolph, 2004), Enzyme der Klasse B2 ausschließlich ein Zinkion (Garau *et al.*, 2005). Gemäß ihrer Substratspezifität können die Klasse A- β -Lactamasen als Penicillinasen, Klasse C-Enzyme als Cephalosporinasen und Klasse D-Enzyme als Oxacillinasen bezeichnet werden (Frère, 1995). Da β -Lactam-Antibiotika breiten Einsatz finden, haben sie zur Evolution von β -Lactamasen mit einem erweiterten Substratspektrum (*extended-spectrum β -Lactamases*, *ESBL*) und der Entwicklung neuer plasmidcodierter AmpC β -Lactamasen geführt (Fisher *et al.*, 2005; Poole, 2004).

Die Expression von β -Lactamase wird durch ein System aus einem Repressor BlaI und einem Rezeptor BlaR reguliert, wobei der genaue Regulationsprozeß noch nicht bekannt ist. Kristallstrukturen der beiden Komponenten geben jedoch erste Einblicke (Melckebeke *et al.*, 2003; Safo *et al.*, 2005; Kerff *et al.*, 2003).

1.8.2 TEM-1 β -Lactamase: Struktur und Aktivität

Die TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli* gehört zu den Klasse A β -Lactamasen, die weitgehend plasmidcodiert und sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien weit verbreitet sind (Petrosino *et al.*, 1998). Die TEM-1 β -Lactamase ist auf dem Tn3-Transposon codiert (Datta und Kontomichalou, 1965). Es handelt sich um ein monomeres Protein (263 Aminosäuren), das aus zwei Domänen besteht. Die erste Domäne ist aus fünf β -Strängen und drei α -Helices aufgebaut, die zweite Domäne aus sechs α -Helices und vier 3_{10} -Helices (Herzberg, 1991). Das aktive Zentrum des Enzyms ist an der Domänengrenzfläche lokalisiert.

Der sogenannte Omega-Loop, der die Reste 161-179 umfaßt, bildet den Eingang zum aktiven Zentrum. Für die Katalyse sind die Reste Ser70, Lys73, Glu166 und Asn170 wichtig. Ser70 ist das katalytisch aktive Nukleophil, welches den β -Lactamring angreift, Lys73 trägt im aktiven Zentrum zur Ausbildung eines komplexen Wasserstoffbrückennetzwerks bei. Glu166 und Asn170 positionieren das für die Hydrolyse des Acylintermediats nötige Wassermolekül (Lamotte-Brasseur *et al.*, 1991). Die TEM-1 β -Lactamase enthält eine Disulfidbrücke zwischen den Resten Cys77 und Cys123. Auch in Abwesenheit der Disulfidbrücke liegt das Protein in nativer Konformation vor, ist allerdings um 14 kJ/mol gegenüber dem Wildtyp-Protein destabilisiert (Schultz *et al.*, 1987; Vanhove *et al.*, 1997). Das disulfidfreie Protein zeigt weiterhin β -Lactamase-Aktivität. Bei thermischer Denaturierung des Proteins ist jedoch nach anschließender Rückfaltung keine Aktivität mehr meßbar (Vanhove *et al.*, 1997). Die Struktur von TEM-1 β -Lactamase basierend auf den Kristallstrukturdaten (Jelsch *et al.*, 1993) ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

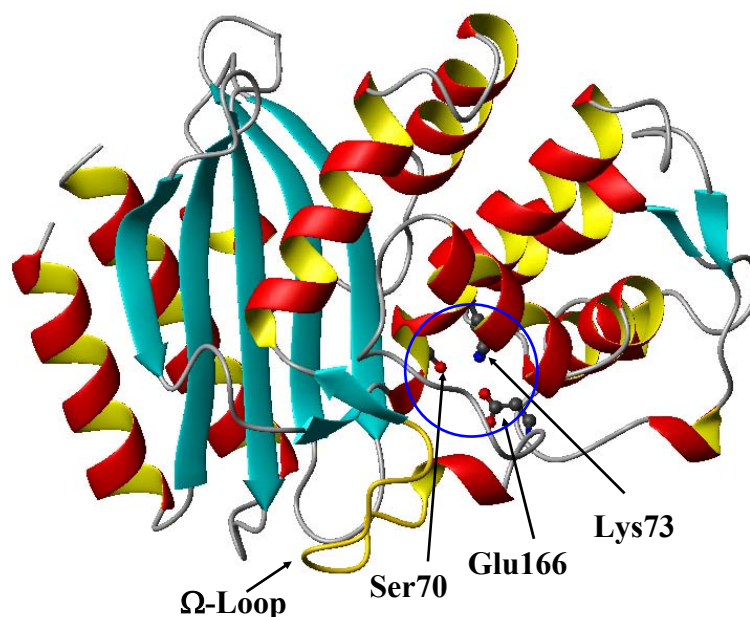


Abbildung 1.4: Struktur der TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli*. Dargestellt sind die Sekundärstrukturelemente in der Bänderdarstellung. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol erstellt und basiert auf den Kristallstrukturdaten der TEM-1 β -Lactamase (Jelsch *et al.*, 1993, *pdb-file* 1btl).

Die β -Lactamase dient als ein Modellprotein zur Untersuchung der Prinzipien von Aktivität und Stabilität. Aus einer Vielzahl von Untersuchungen sind bereits Positionen und Mutationen bekannt, welche die Stabilität der β -Lactamase erhöhen. Dazu gehört die in der Natur vorkommende Mutation M182T (Sideraki *et al.*, 2001) sowie die Mutation E104K (Raquet *et al.*, 1995). Mutationen, welche die Aktivität des Enzyms beeinflussen, sind in der Nähe des aktiven Zentrums (R164S, A237T, G238S und E240K), aber auch in der Struktur weit von diesem entfernt (Q39K, M182T) lokalisiert. Diese zwei Typen von Mutationen haben

unterschiedliche Effekte auf die Aktivität. Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums erhöhen die katalytische Effizienz, während Mutationen entfernt von der Bindungstasche der Aktivität entgegenwirkende Stabilitätsdefekte kompensieren (Huang und Palzkill, 1997). Mutagenese-Experimente haben gezeigt, daß die meisten Mutationen im Omega-Loop die Hydrolyse-Aktivität gegenüber Ceftazidim erhöhen (Petrosino und Palzkill, 1996; Palzkill *et al.*, 1994). Die Wildtyp-Aminosäuren 164-179 sind in ionischen Wechselwirkungen involviert, die diese Region stabilisieren (Jelsch, 1993). Mutationen in diesem Bereich der β -Lactamase vermindern sterische Spannungen, ermöglichen eine Vergrößerung der Bindungstasche und damit eine Änderung in der Substratspezifität (Petrosino und Palzkill 1996; Palzkill *et al.*, 1994).

1.9 Problemstellung der Arbeit

Gerichtete Evolution stellt eine effektive Methode zur Stabilisierung von Proteinen dar, die nicht auf die Kenntnis der Struktur-Funktions-Beziehung in Proteinen angewiesen ist. Sie ist besonders attraktiv, weil sie die gleichen Prinzipien (Mutation und Selektion) verwendet wie die natürliche Evolution, die alle Proteine hervorgebracht hat. Die *Proside*-Selektionsmethode (*protein stability increased by directed evolution*) verknüpft eine erhöhte Proteaseresistenz stabilisierter Proteinvarianten mit der Infektiosität filamentöser Phagen (Sieber *et al.*, 1998). Die Anwendung des Selektionssystems ist oft dadurch limitiert, daß bei der Phagenassemblierung die Cysteine des G3P falsche Disulfidbrücken mit möglichen Cysteinen des Gastproteins ausbilden. Die entsprechenden Phagen weisen eine stark verminderte Infektiosität auf. Es sollte deshalb ein stabiles und funktionsfähiges disulfidfreies G3P mittels *Proside* entwickelt werden. Dazu sollte die Selektion disulfidfreier Varianten auf der Grundlage eines bereits stabilisierten G3P (Martin und Schmid, 2003b) verfolgt und die strukturellen, kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der erhaltenen G3P-Varianten anhand entsprechender biophysikalischer Methoden genauer untersucht werden. Eine zusätzliche Anforderung an die selektierten G3P-Varianten ist der Erhalt der biologischen Funktion, also der Infektiosität der Phagen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte auch die Rolle der C-terminalen Domäne des G3P für den Infektionszyklus geklärt werden. Im Vordergrund stand dabei der Einfluß der CT-Domäne auf Stabilität und Funktionalität des N1N2-Fragments.

Für die industrielle Anwendung ist die Stabilisierung größerer Proteine und Enzyme von besonderem Interesse. Ein weiteres Ziel der Arbeit war deshalb die Anwendung des *Proside*-Selektionssystems zur Stabilisierung größerer Gastproteine bzw. Enzyme. Als Modellprotein diente hier die TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli*, die mittels *Proside* unter Erhalt ihrer Aktivität stabilisiert werden sollte. β -Lactamase eignet sich hierfür gut, da sowohl die Struktur als auch ihre Aktivität intensiv analysiert wurde und das Verständnis der Prinzipien von Stabilität und Aktivität dieses Enzyms im Hinblick auf das Design neuer Antibiotika von großem Interesse ist. Auch in diesem Fall war die biophysikalische Charakterisierung der stabilisierten Varianten vor dem Hintergrund der strukturellen Umgebung Ziel der Arbeit.

Neben der Anwendung von *Proside* sollte ein alternatives System zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten entwickelt werden, welches die beim *Proside*-System auftretenden Probleme umgeht. Die Infektiosität der Phagen im *Proside*-System korreliert mit der Größe der insertierten Gastproteine und führt zu stark eingeschränkten Bibliotheksgrößen. Außerdem ist die Selektion stabilisierter Proteinvarianten durch einen Verlust des Gastproteins aufgrund illegitimer Rekombination limitiert. In einem alternativen Selektionssystem sollte deshalb die Infektiosität der Phagen von der Größe des Gastproteins unabhängig und das Problem der Anreicherung rekombinanter Phagen gelöst sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Phagenpropagation, die Produktion von Plasmid-DNA und die Expression von Proteinen wurden folgende *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme verwendet.

E. coli

TG1	F' <i>traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/supE Δ(hsdM-mcrB)</i> 5 (<i>r_k⁻m_k⁺McrB⁻</i>), <i>thiΔ (lac-proAB)</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
XL1 Blue	<i>recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> , [F' <i>proAB, lacI^qΔM15, Tn10 (Tet^r)</i>]	Stratagene (La Jolla, USA)
BL21 (DE3) pLysS	<i>E. coli B F⁻, dcm, ompT, hsdS (rB⁻ mB⁻), gal λ(DE3), [pLysS, Cam^r]</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
RB791	F' [<i>lacI^qL8</i>] <i>hsdR⁺ hsdM</i>	A. Matagne (Lüttich, Belgien)

Die F-Pilus-tragenden *E. coli*-Stämme TG1 und XL1 Blue wurden zur Phagenpropagation verwendet; letzterer diente auch der Produktion von Plasmid-DNA verwendet.

Die Bakterienstämme *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* RB791 wurden zur Expression von Proteinen verwendet. Das Plasmid pLysS codiert T7-Lysozym, das geringe Mengen von T7-RNA-Polymerase bindet und dadurch die Expression in nichtinduzierten *E. coli* BL21-Zellen verhindert.

Die Gen-3-Protein- und β-Lactamase-Bibliotheken wurden im Phagen fd bzw. im stabilisierten Phagen fd G3P* mit den Mutationen T13I, T101I, Q129H und D209Y (Martin und Schmid, 2003b) erstellt.

Als Expressionvektoren wurden die folgenden Plasmide verwendet:

pET 11a	Klonierung des Gen-3-Proteins-Gens als <i>NdeI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment	Novagen, Schwalbach, D
pTAC11	Klonierung des <i>E. coli</i> TEM-1 β- Lactamase-Gens als <i>StuI</i> / <i>XbaI</i> -Fragment	A. Matagne (Lüttich, Belgien)

Der Vektor pET 11a enthält eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion. Das Plasmid pTAC11 enthält nur die klonierte β-Lactamase als Selektionsmarker. (Das Ausgangsplasmid wurde zur Klonierung der Varianten so verändert, daß eine Kanamycin-Resistenz in den β-Lactamase-codierenden Bereich des Plasmids eingeführt wurde.)

2.1.2 Oligodesoxyribonukleotide

Die zur Erstellung der Phagenkonstrukte und –bibliotheken sowie zur Klonierung der Gen-3-Protein-Varianten und der β-Lactamase-Varianten verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von den

Firmen MWG Biotech (Ebersberg, D), Biomers (Ulm, D) und Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen und sind im Anhang (9.1) aufgeführt.

2.1.3 Nährmedien

dYT-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton
 feste Nährböden: dYT-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar

Dem autoklavierten Medium bzw. den Nährböden wurden je nach Resistenz der zu kultivierenden Bakterien 20 µg/ml bzw. 300 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Chloramphenicol in Form sterilfiltrierter Lösungen zugegeben.

2.1.4 Enzyme

Taq- und *Pfu*-DNA-Polymerase

M. Wunderlich (Uni Bayreuth)
 bzw. Promega (Madison, USA)

Restriktionsendonukleasen:

*Bam*HI, *Nde*I, *Nhe*I, *Dpn*I, *Alw*NI,
*Bts*I, *Stu*I, *Xba*I, *Kpn*I, *Sfi*I, *Hind*III
*Pst*I

New England Biolabs
 (Schwalbach, D)
 Promega (Madison, USA)

T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotid-Kinase

Invitrogen (Karlsruhe, D)

Shrimp-Alkalische Phosphatase (SAP)

MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)

New England Biolabs
 (Schwalbach, D)

Chymotrypsin, Lysozym

Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)

2.1.5 Längenstandards

Bench Mark[™] Protein Ladder

Invitrogen (Karlsruhe, D)

pUC19 DNA / *Msp*I (*Hpa*II)-Marker

MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)

Lambda DNA / *Eco*130I (*Sty*I)-Marker

2.1.6 Chemikalien und Biochemikalien

Ammoniumhydrogencarbonat NH₄HCO₃,

Fluka (Neu-Ulm)

Chloroform/Isoamylalkohol, DTT,

Imidazol, PEG 8000

IPTG, Ampicillin

GERBU (Gaiberg)

Guanidiniumchlorid (ultra pure)

ICN Biomedicals (Aurora, Ohio)

Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP),

Roth (Karlsruhe, D)

Adenosin-5'-Triphosphat

Agarose, 30% Acrylamidlösung („Rotiphorese 30“),

EDTA, Ethidiumbromid, Phenol,

Roti-Load-Proteinauftragspuffer, Tris

Ammoniumpersulfat, SDS, TEMED

Serva (Heidelberg)

Antifoam, Silica (S-5631), Bromphenolblau,

Sigma Aldrich (Deisenhofen)

Chloramphenicol, Coomassie Brilliant Blue G

Alle anderen Chemikalien im Reinheitsgrad p.A. wurden von Merck (Darmstadt, D) bezogen. Für alle Pufferlösungen wurde deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit kleiner 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet. Puffer für spektroskopische Messungen wurden über 0,45 μM -Nylonfilter filtriert.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien, Materialien für die Chromatographie

Millipore-Filter Typ VS (Porengröße 0,025 μm)	Millipore (Bedford, USA)
NAP TM 10 Columns (Sephadex TM G-25 DNA Grade),	Pharmacia (Freiburg, D)
HiLoad Superdex TM 75 16/60 prep grade-	
Gelfiltrationssäule, Fractogel EMD TMAE-650 (M),	
Pharmacia-FlexiPrep-Kit	
Ni-NTA-Superflow-Agarose und	Qiagen (Hilden, D)
Ni-NTA-Spin Columns	
His-Bind TM Magnetic Agarose beads,	Novagen (Schwalbach, D)
Thiol-Sepharose 4B	GE Healthcare (Freiburg, D)
Sterilfilter 0,22 μm , Membranfilter 0,45 μm	Fisher Scientific (Schwerte, D)
Millipore-Filter Typ VS (Porengröße 0,025 μm)	Millipore (Bedford, USA)
Spectra/Por-Dialysesschläuche,	Spectrum (Los Angeles, USA)
Ausschlußgrenze 3,5 kD	

2.1.8 Geräte

Easyject Prima Elektroporationsapparatur	Peqlab (Erlangen, D)
Sonifier B15 Ultraschall Desintegrator	Branson (Heusenstamm, D)
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
Hitachi-Fluoreszenzspektrophotometer	Hitachi (Tokio, Japan)
F-4010, F-4500	
Jasco-Fluoreszenzspektrofluorimeter (FP-6500),	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Jasco J-600 Spektropolarimeter	
mit PTC-348 WI Peltier-Element	
DX.17MV Sequential <i>Stopped-Flow</i>	Applied Photophysics
Spektrofluorimeter	(Leatherhead, UK)
Uvikon 860 Spektrophotometer	Kontron Instruments (Neufahrn, D)
Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer	Varian (Darmstadt, D)
HP8452 Dioden-Array-Spektrophotometer	Hewlett Packard (Waldbronn, D)
VP-DSC Mikrokolorimeter	MicroCal
	(Northampton, MA, USA)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil	Hellma (Mühlheim, D)
Microfluidizer M-110L	Microfluidics (Newton MA, USA)
Thermocycler PTC 100 (Mini-Cycler)	MJ Research (Watertown, USA)
FPLC-Anlage , 2050 MIDGET Electrophoresis Unit	Pharmacia (Freiburg, D)
Bio-Print Darkroom CN-UV / WL	LTF Labortechnik
	(Wasserburg, D)
Transilluminator 302 nm	Bachhofer (Reutlingen, D)

Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage
 Kühlzentrifuge „Sorvall RC5B Plus“
 Thermoschüttler “Thermomixer 5436”
 Haake Thermostate K und CH
 Refraktometer
 Micromass LCT, ESI-TOF Massenspektrometer
 Seralpur PRO 90 CN Reinstwasser-Anlage

Christ (Osterode, D)
 DuPont (Bad Homburg, D)
 Eppendorf (Hamburg, D)
 Haake (Karlsruhe, D)
 Krüss (Hamburg, D)
 Micromass (Manchester, UK)
 Seral (Ransbach-Baumbach, D)

2.1.9 Computer-Software

Grafit Version 3.0
 Rasmol Version 2.7.1.1
 Swiss-Pdb Viewer Version 3.7

MolMol Version 2K.2
 Pymol

Biocapt
 OligoDemo Version 5.0

Chromas Version 1.45

MassLynx 3.5
 Origin 5.0

Erithacus Software (Staines, UK)
 BioSym (San Diego, USA)
 GlaxoSmithKline (München, D),
 (Guex & Peitsch, 1997)
 (Koradi *et al.*, 1996)
 DeLanoScientific LLC
 (San Francisco, USA)
 LTF-Laborteknik (Wasserburg, D)
 National Biosciences
 (Plymouth, MN, USA)
 Technelysium
 (Helensvale, Australien)
 Waters (Eschborn, D)
 MicroCal Software INC,
 (Northampton, MA, USA)

2.2 Elektrophoretische Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x): 40 mM Tris, pH 8,0 (20°C), 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA
 Probenpuffer: 4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin,
 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde präparativ zur Reinigung und Trennung oder analytisch zur Identifizierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten genutzt.

Abhängig von der Länge der aufzutrennenden DNA wurden Agarosekonzentrationen von 0,6 % bzw. 1,6 % (w/v) in 0,5 x TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer in 0,5 x TAE-Puffer für 30 min. Die angelegte Spannung betrug 125 V (6 V pro cm Elektrodenabstand). Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid-Färbelösung 5-10 min angefärbt (ca. 2 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5 x TAE-Puffer), für weitere 5-10 min in TAE-Puffer entfärbt und im UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) identifiziert.

2.2.2 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4x Roti-Load-Probenpuffer:	200 mM Tris/HCl, pH 7,0 (25 °C), 120 mM DTE, 40 mM EDTA, 48 % (w/v) Glycerin, 15 % (w/v) SDS, 0,04 % Bromphenolblau
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl, pH 8,45, 0,3 % SDS
Kathoden-Puffer:	0,1 M Tris/HCl, pH 8,23 (25°C), 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS
Anoden-Puffer:	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9 (25°C)
Fixier-Lösung:	20 % (w/v) Trichloressigsäure
Coomassie-Färbelösung:	45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau
Entfärbe-Lösung:	10 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol

Bei der Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow wird Tricin als Folgeion verwendet (Schägger *et al.*, 1987). Dieses Verfahren ermöglicht eine gute Trennung von Proteinen zwischen 5 und 20 kD.

Zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Elektrophoresegele mit 10 %igem Trenngel verwendet. Die Polymerisation von 25 ml entgaster Lösung des Trenngels (8,2 ml H₂O, 8,2 ml Gelpuffer, 8,4 ml 30 % Acrylamidlösung) wurde durch Zugabe von 200 µl 10 % (w/v) APS und 15 µl TEMED (Endkonzentration jeweils 0,05 %) gestartet. Das ca. 5 cm hoch gegossene Trenngel wurde sofort mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und abgedeckt. Nach ca. 1 h Polymerisation wurde das Isobutanol abgegossen und durch gründliches Spülen mit vollentsalztem H₂O vollständig entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel (8,0 ml H₂O, 3,3 ml Gelpuffer, 1,9 ml 30 % Acrylamidlösung) entgast, durch Zugabe von 100 µl 10 % (w/v) APS und 10 µl TEMED die Polymerisation gestartet und nach kurzem Durchmischen das ca. 1,5 cm hohe Sammelgel gegossen. Nach dem Einsetzen der Kämme wurde das Gel etwa 1 h abgedeckt zur Polymerisation stehengelassen. Die Gele wurden bei 4°C gelagert.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 18 µl der Fraktionen (4-10 µg Protein) mit 6 µl SDS-Probenpuffer (4x) versetzt und anschließend 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde das Gel beladen. Die Elektrophorese wurde in einer MIDGET-Vertikal-Elektrophorese-Apparatur durchgeführt. Beim Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Stromstärke von 20 mA gewählt (ca. 30 min), im Trenngel wurde die Stromstärke auf 40 mA erhöht (ca. 60 min). Anschließend wurde das Gel für 15 min fixiert, 2 h Stunden in Coomassie-Lösung gefärbt und mehrere Stunden entfärbt.

2.3 Isolierung und Reinigung von DNA

2.3.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen und Reinigung mit Silica

PBS-Puffer:	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Waschpuffer:	50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2,5 mM EDTA, 50 % Ethanol
Silica-Suspension (100 mg/ml):	1g Silica in 10 ml 3 M NaI

Zur Abtrennung bestimmter DNA-Fragmente von Fragmenten anderer Länge nach Restriktion oder PCR wurde die DNA im Agarosegel aufgetrennt, das Fragment gewünschter Länge ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Gelstück wurde 1 ml 6 M NaI gegeben, der Ansatz

anschließend (zum Schmelzen der Agarose) 5 min bei 55 °C geschüttelt. Nach Zugabe einer geeigneten Menge Silica-Suspension (1 mg bindet ca. 3 µg DNA) wurde der Ansatz zur Bindung der DNA 5 min auf Eis inkubiert (DNA bindet bei hoher Ionenstärke an Silica). Das Silica wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet dreimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde nochmals kurz abzentrifugiert, um den Puffer anschließend restlos zu entfernen. Die Elution der DNA erfolgte in einem Bettvolumen ddH₂O für 5 min bei 45 °C. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Das gleiche Prinzip wurde zur Konzentrierung und Entsalzung von DNA angewendet.

2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Phagen-DNA

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA

Zur Präparation einzelsträngiger Phagen-DNA wurde das aus 3 ml ÜNK nach 2.8.1 erhaltene Phagenpellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Proteinhülle der Phagen wurde durch Zugabe von 50 µl Phenol/Tris, zweimaligem starkem Schütteln (Vortex-Mixer) für 30 sec, Zentrifugation (13 000 rpm, 4 °C, 1 min) und anschließendem Abnehmen der ssDNA-haltigen Oberphase abgetrennt. Anschließend erfolgte zusätzlich eine Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Fällung unter den gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde zur Ethanolpräzipitation der einzelsträngigen DNA in ein Reaktionsgefäß mit 300 µl vorgelegtem Ethanol (96 %) / 3 M Na-Acetat (pH 5,2) im Verhältnis 25:1 überführt. Nach 15minütigem Fällern der DNA bei Raumtemperatur wurde 10 min zentrifugiert (13 000 rpm, 4 °C), die präzipitierte ssDNA mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei RT getrocknet. Die in 20 µl TE-Puffer resuspendierte ssDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Präparation von doppelsträngiger DNA

Zur Präparation von doppelsträngiger Phagen- und Plasmid-DNA wurden 5 ml-Übernachtskulturen (ÜNK) der entsprechenden *E. coli* XL1 Blue-Zellen bei 37 °C inkubiert. Das aus 1,5 ml abzentrifugierter ÜNK entstandene Zellpellet wurde mit dem *Pharmacia-FlexiPrep-Kit* (Pharmacia, Uppsala, Schweden) zur DNA-Präparation gemäß den Angaben des Herstellers behandelt. Dabei erfolgte der Zellaufschluß nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989); die DNA wurde mit 50 µl ddH₂O von der Anionenaustauschermatrix eluiert.

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.4.1 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Pfu-Reaktionspuffer (10x): 200 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA

Die PCR wird zur exponentiellen Anreicherung von DNA-Fragmenten verwendet. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte im 100 µl-Ansatz unter Verwendung von *Pfu*-Polymerase. *Pfu*-Polymerase besitzt eine 3'-Exonuclease-Aktivität und damit eine geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase. Für die PCR wurden 10 µl 10x-*Pfu*-Puffer, 3 µl 10 mM dNTPs (Endkonzentration 300 µM), je 4 µl 10 µM Primer (Endkonzentration 400 nM), 0,5 µl *Template*-DNA (~100 ng/µl) und 78 µl ddH₂O gemischt. Die Reaktion wurde im Thermocycler nach Aufheizen auf 95 °C durch Zugabe

von 3 U *Pfu*-Polymerase gestartet („*hot start*“). Der Ansatz wurde zunächst für 2 min auf 95 °C aufgeheizt, anschließend wurden 30 Zyklen von je 15 s 95 °C zur Denaturierung der DNA, 15 s bei entsprechender Temperatur zur Primer-Anlagerung und 40 s bei 72 °C zur Polymerisation durchgeführt. Abschließend erfolgte eine zehnmünütige Polymerisation bei 72 °C. Zur Überprüfung des amplifizierten Produkts wurden 5 µl des Ansatzes entnommen, mit 5 µl ddH₂O und 2 µl Probenpuffer versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese (zusammen mit dem entsprechenden Längenstandard) unterworfen.

2.4.2 Kolonie-PCR

Mg-freier Puffer für *Taq*-Polymerase (1x): 10 mM Tris/HCl (pH 9,0, 25 °C), 50 mM KCl,
0,1 % Triton-X-100

Die Kolonie-PCR ermöglicht einen Nachweis direkt von der Platte, indem einzelne Kolonien gepickt und in einem 10 µl-Ansatz einer PCR mit *Taq*-Polymerase unterzogen werden. Da die PCR in diesem Fall nur zu Kontrollzwecken dient, ist die Verwendung der fehleranfälligen *Taq*-Polymerase ausreichend. Pro 50 µl-Ansatz wurden für die PCR 5 µl Mg-freier Puffer (10x), 5 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl dNTPs (10 mM), je 1 µl Primer (10 µM), 1 U *Taq*-Polymerase und 37 µl ddH₂O zusammengegeben. Das Zellmaterial einer Kolonie wurde jeweils in einen 10 µl-Ansatz gemischt, anschließend wurden 50 µl dYT-Medium mit dem restlichen Zellmaterial angeimpft, um mögliche positive Klone kultivieren zu können (Vorkultur für ÜNK). Die PCR erfolgte nach dem in 2.4.1 beschriebenen Temperaturprogramm.

Zur Überprüfung des Produkts auf die richtige Länge wurden die Ansätze mit 2 µl Probenpuffer versetzt und im 1,6 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.4.3 Blunt-end-Mutagenese

Pfu-Reaktionspuffer (10x): 200 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA
T4-PNK-Puffer (1x): 70 mM Tris/HCl, pH 7,6 (25°C), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x): 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT,
25 % PEG-8000

Mittels *Blunt-end*-Mutagenese wurden Mutationen in das Phagengenom und in Plasmide eingebracht. Bei der *Blunt-end*-Mutagenese werden gegenläufige Primer verwendet. In der folgenden *Blunt-end*-Ligation wird dann das lineare PCR-Fragment zirkularisiert.

Die PCR erfolgte im 50 µl-Ansatz unter Verwendung von *Pfu*-Polymerase. Pro 50 µl-Ansatz wurden 5 µl 10x-*Pfu*-Reaktionspuffer, 1,5 µl dNTPs (10 mM), je 2 µl Primer (10 µM), 0,5 µl *Template*-DNA (~100 ng/µl) und 38,5 µl ddH₂O zusammengegeben. Die Reaktion wurde im Thermocycler nach Aufheizen auf 95 °C durch Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase gestartet („*hot start*“). Der Ansatz wurde zunächst für 2 min auf 95 °C aufgeheizt, anschließend wurden 25 Zyklen von je 30 s 95 °C zur Denaturierung der DNA, 30 s bei entsprechender Temperatur zur Primer-Anlagerung und 15 min (bzw. 2 min pro kb DNA-Länge) bei 72 °C zur Polymerisation durchgeführt.

Das lineare PCR-Fragment wurde im 30 µl-Ansatz phosphoryliert. Dazu wurden 27 µl des gereinigten PCR-Produkts (siehe 2.3.1), 3 µl 10x-T4-Polynukleotidkinase-Puffer und 10 U T4-Polynukleotidkinase zusammengegeben und 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das gereinigte phosphorylierte Fragment in einer *Blunt-end*-Ligation zirkularisiert. Dazu wurden 27 µl des Fragments, 3 µl T4-DNA-Ligase-Puffer, 3 µl 10 mM rATP und 5 U T4-DNA-Ligase zusammengegeben und 4 h bei 18 °C inkubiert.

Mit 5 µl des Ligationsansatzes wurden elektrokompente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert (2.6.1). Einzelne Kolonien wurden in dYT-Medium überimpft und daraus DNA isoliert (2.3.3). Die erhaltene DNA wurde durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen, D) auf die gewünschte Sequenz geprüft.

2.5 QuikChange ortsgerichtete Mutagenese

Pfu-Reaktionspuffer (10x): 200 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA

Die QuikChange-Reaktion (lineare PCR) wurde zur ortsgerichteten Mutagenese des Phagengenoms und des in den Expressionsvektor klonierten G3Ps verwendet.

Für die Reaktion wurden 50 µl-Ansätze gewählt, wobei 40 µl ddH₂O, 5 µl *Pfu*-10x-Puffer, 1,5 µl 10 mM dNTPs (Endkonzentration 300 µM), je 2 µl 10 µM (+)- bzw. (-)-Strang-Primer mit der gewünschten Mutation (Endkonzentration 400 nM) und 0,5 µl *Template*-DNA (~100 ng/µl) gemischt und im Thermocycler auf 95°C aufgeheizt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 U *Pfu*-Polymerase gestartet. Die QuikChange-Reaktion wurde mit dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 2 min Aufheizen auf 95 °C, anschließend 25 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 95 °C, 45 s Primer-Anlagerung bei der entsprechenden Temperatur (je nach Länge des Primers zwischen 55 °C und 60 °C) und 15 min (bzw. 2 min pro kb DNA-Länge) Polymerisation bei 68 °C.

Das Produkt der Reaktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese auf die gewünschte Länge hin überprüft. Da die *Template*-DNA im Gegensatz zu der *in vitro* synthetisierten mutierten DNA methyliert vorliegt, kann sie spezifisch durch Inkubation mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut werden. *DpnI* besitzt eine Erkennungssequenz aus vier Basen, welche ein methyliertes Adenin enthält, und ist daher für methylierte und hemimethylierte DNA spezifisch. Dem Produkt der QuikChange Reaktion wurden 20 U *DpnI* zugesetzt. Nach 3 h Spaltung bei 37 °C erfolgte die Transformation elektrokompenter *E. coli* XL1 Blue-Zellen mit 5 µl des Ansatzes gemäß 2.6.1 Zur DNA-Präparation wurden ÜNKs angelegt und wie unter 2.3.3 beschrieben behandelt.

2.6 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.6.1 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* wurden 500 ml dYT-Medium mit 1 ml einer ÜNK von *E. coli* XL1 Blue-Zellen angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,7 bei 30 °C inkubiert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 5 000 rpm und 4 °C im GS-3-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 ml sterilem ddH₂O gewaschen und erneut bei 5 000 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde in 250 ml kaltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde nochmals

in 10 ml 10 % (v/v) Glycerin suspendiert und 10 min im SS34-Rotor bei 6 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 1,5 ml 10 % Glycerin wurden 40 µl-Aliquots der elektrokompenten Zellen bei -80 °C eingefroren.

Die zu transformierende DNA wurde zunächst 10-15 min lang einer Mikrodialyse gegen ddH₂O unterworfen. Der dialysierte Ansatz wurde in das Reaktionsgefäß mit den auf Eis aufgetauten elektrokompenten *E. coli* XL1 Blue-Zellen (40 µl) pipettiert. Die Zellsuspension wurde in eine (gekühlte) Elektroporationsküvette überführt und der Elektroporation bei 2500 V unterzogen. Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 700 µl dYT-Medium versetzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Im Falle der Transformation von Chloramphenicolresistenz vermittelnder DNA wurden die Zellen zur Expression des Resistenzgens 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert (4 000 rpm, 30 s). Nach Abgießen des Überstands wurde das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf dYT-Platten mit Ampicillin bzw. Chloramphenicol ausplattiert (Ausnutzung der durch pET 11a verliehenen Ampicillinresistenz bzw. der durch den Phagen fd verliehenen Chloramphenicolresistenz). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

2.6.2 Herstellung und Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 500 ml dYT-Medium mit einer ÜNK von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS angeimpft und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 inkubiert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und bei 7 000-8 000 rpm und 4 °C 15 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation bei 5 000 rpm und 4 °C für 15 min wurde das erhaltene Pellet in 4 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde 1 ml steriles Glycerin gegeben (Endkonzentration 20 %). Die Zellsuspension wurde aliquotiert (200 µl-Aliquots) und bei -80 °C eingefroren.

Zur Expression der verschiedenen Gen-3-Protein-Varianten wurden CaCl₂-kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen verwendet. Zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden 3 µl der präparierten DNA zugegeben und 15 min auf Eis stehen gelassen. Die Transformation erfolgte durch 45 s Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurden 700 µl dYT-Medium zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen (30 s, 4 000 rpm) wurde das Medium abgegossen, das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf dYT-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

2.7 Generieren einer Phagenbibliothek

2.7.1 Erstellen der Genbibliothek

T4-PNK-Puffer (1x):	70 mM Tris/HCl, pH 7,6 (25 °C), 10 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT
<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer (10x):	200 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgSO ₄ , 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA

Zur Erstellung der Gen-3-Protein- bzw. Gastproteinbibliotheken wurde im Falle der Sättigungsmutagenese eine Standard-PCR gemäß 2.4.1 mit degenerierten Oligodesoxyribonukleotiden durchgeführt. Die für die jeweilige Bibliothek verwendeten Primer sind im Anhang in 9.1 aufgelistet.

Für die Zufallsmutagenese des G3P bzw. der β -Lactamase wurde eine fehlerbehaftete PCR durchgeführt. Im Gegensatz zum Standard-PCR-Ansatz wurde die Konzentration an dNTPs reduziert (40-200 μ M), dem Ansatz wurden 0,5 mM MnCl_2 und 2,5-5 mM MgCl_2 zugesetzt. Mit flankierenden Primern wurde das Gen mit *Taq*-Polymerase amplifiziert. Die mutierten Gen-Fragmente, die das jeweils komplette Gastprotein codierten, wurden wie unter 2.3.1 beschrieben gereinigt.

Die Genbibliotheken wurden im 30 μ l-Ansatz phosphoryliert. 27 μ l PCR-Fragment wurden mit 3 μ l 10 mM rATP (Endkonzentration 1 mM) und 3 μ l 10x-PNK-Puffer sowie 10 U T4-Polynucleotidkinase (PNK) gemischt und 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

Zum Einbau des mutierten G3P- bzw. Gastprotein-Fragments in das Phagen genom wurde dieses mit einzelsträngiger Phagen-DNA ((+)-Strang) hybridisiert und komplementär zu dieser mittels *Pfu*-Polymerase zum vollständigen (-)-Strang ergänzt („Auffüllreaktion“). Dazu wurden 3 μ l *Pfu*-10x-Puffer, 3 μ l 10 mM NAD^+ , 1,5 μ l dNTPs, 8 μ l ssDNA (jeweilige Phagen-Matrizen-DNA), 11 μ l phosphoryliertes Fragment, 3 U *Pfu*-Polymerase und 20 U *Taq*-Ligase gemischt und im Thermocycler inkubiert. Das Temperaturprogramm umfasste 1 min Denaturierung bei 95 °C, 2 min Hybridisierung des Fragments bei 58-65 °C (je nach Fragmentlänge der Bibliothek) und 2h Polymersation bei 68 °C.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Polymerisation der DNA-Fragmente zum vollständigen (-)-Strang wurden vor und nach der Reaktion je 4 μ l des Ansatzes entnommen, mit jeweils 6 μ l ddH_2O und 2 μ l Probenpuffer versetzt und im Agarose-Gel aufgetrennt.

2.7.2 Herstellung der Phagenbibliothek

10 μ l des Produkts aus der Auffüllreaktion wurden wie unter 2.6.1 beschrieben mikrodialysiert, damit *E. coli* XL1 Blue-Zellen transformiert und auf dYT-Medium mit 25 μ g/ml Chloramphenicol (Cm) ausplattiert. Um den Phagentiter nach der Transformation zu bestimmen, wurden 10 μ l des Transformationsansatzes für eine Verdünnungsreihe in Schritten von 1:10 in dYT-Medium entnommen. Von den Verdünnungsstufen wurden je 2 μ l auf dYT-Medium mit 25 μ g/ml Chloramphenicol aufgetragen und bei 37 °C inkubiert. Der ausplattierte Transformationsansatz ergab einen Bakterienrasen, der in ~5 ml dYT-Medium resuspendiert, von der Platte abgenommen und in 5 ml frischem dYT-Medium + Cm 2-3 h bei 37 °C inkubiert wurde. Die folgende Phagenpräparation gemäß 2.8.1 lieferte eine Phagenbibliothek, in der Geno- und Phänotyp gemischt sein konnten, da durch die Auffüllreaktion zum vollständigen (-)-Strang ein Hybrid-Doppelstrang aus Wildtyp-DNA und DNA der Mutante entstand. Um sicherzustellen, daß die an der Oberfläche präsentierten Gen-3-Protein bzw. Gastprotein-Varianten mit der genetischen Information im Phagenpartikel übereinstimmen, wurde erneut eine 5 ml-*E. coli* XL1 Blue-Kultur mit 50 μ l präparierten Phagen infiziert. Durch Phagenpräparation wurde nun die gewünschte Phagenbibliothek erhalten.

2.8 Arbeiten mit Phagen

2.8.1 Propagation und Isolierung von Phagen

PEG-Lösung: 30 % PEG 8000, 1,5 M NaCl

PBS-Puffer: 80 g NaCl (1,37 M), 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, ad 1 l ddH₂O

Zur Vermehrung von fd-Phagen wurden 5 ml einer *E. coli* XL1 Blue bzw. einer *E. coli* TG1-Kultur in dYT-Medium nach Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 1,0 mit 50 µl Phagensuspension (entsprechen ca. 10⁹ Phagen bei durchschnittlich 10¹⁰-10¹¹ cfu/ml der Phagensuspension) infiziert. Nach 30 min Infektionszeit wurden 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben (fd-Phagen vermitteln Chloramphenicol-resistenz. Zur Expression der Chloramphenicolacetyltransferase inkubiert man die Zellen nach Infektion 30 min bei 37 °C). Die Kultur wurde dann mindestens 8 h bei 37 °C zur Phagenproduktion inkubiert.

Zur Isolierung der Phagen wurden 1,5 ml einer ÜNK von mit Phagen infizierten *E. coli* XL1 Blue-Zellen bei 13 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, 1,2-1,3 ml des Überstands in ein Reaktionsgefäß mit 250 µl vorgelegter PEG-Lösung überführt und 15 min bei Raumtemperatur zur Fällung der Phagen inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, das Phagenpellet durch erneute Zentrifugation vom restlichen Medium abgetrennt und in 50 µl PBS + 0,01 % NaN₃ resuspendiert.

2.8.2 Bestimmung der Anzahl infektiöser Phagen

Zum Test der Infektiosität der verschiedenen Phagenkonstrukte bzw. zur Bestimmung der Anzahl infektiöser Phagen in einer Lösung wurden *E. coli* XL1 Blue- bzw. TG1-Zellen infiziert. Zu 495 µl der entsprechenden *E. coli*-Kultur (OD₆₀₀~1) wurden 5 µl der Phagensuspension gegeben und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von 10 µl des Infektionsansatzes wurde eine Verdünnungsreihe in Schritten von 1:10 in dYT-Medium in einer Mikrotiterplatte auf Eis erstellt. 2 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf eine Chloramphenicol-dYT-Agarplatte pipettiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Titerbestimmung erfolgte aus der Zahl der koloniebildenden Einheiten (cfu) durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor.

2.8.3 Proteolyse zur Selektion stabilisierter (Gast)-Proteinvarianten

Die Selektion von Phagen mit stabilisiertem Gen-3-Protein bzw. stabilisierten β-Lactamase-Varianten wurde durch Proteolyse mit Chymotrypsin im 50 µl-Ansatz erreicht. 10 µl Phagensuspension wurden mit 35 µl 100 mM Kalium-Phosphat, 100 µM Calciumchlorid, pH 8,0 gemischt, bei der zur Selektion gewählten Temperatur (zwischen 40 °C und 57,5 °C) im Thermocycler vorinkubiert, und nach 2 bzw. 5 min wurden 5 µl 2,5-25 µM Chymotrypsin zugegeben. Nach Inkubation für weitere 15 min bei entsprechender Temperatur im Thermocycler wurde der gesamte Ansatz zur Infektion einer 5 ml-*E. coli* XL1 Blue-Kultur (OD₆₀₀~1,0) verwendet. Der Kultur wurden nach 30 min Inkubation bei 37 °C 25 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt. Nach mindestens 8 h Inkubation wurden die selektierten Phagen präpariert und einer weiteren Selektionsrunde unterworfen. Zur Bestimmung der Überlebensraten der Phagen bei der Selektion wurden zwei weitere 25 µl-Ansätze mit bzw. ohne Proteasezusatz unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Wie unter 2.8.2 beschrieben, wurden 5 µl dieser Ansätze zur

Infektion von 495 µl *E. coli* TG1-Kultur verwendet und nach 30 min Inkubation einer Verdünnungsreihe unterworfen. Aus dem Verhältnis der Phagentiter mit und ohne Proteolyse konnte die Überlebensrate der Phagen bestimmt werden.

2.8.4 Suppression von Phagen mit Cys-Resten an den randomisierten Positionen im G3P

Im Falle der Bibliotheken zum Ersatz der Disulfidbrücken im Gen-3-Protein mussten Cysteine aus den Bibliotheken ausgeschlossen werden, da die zugehörigen Phagen die deutlich instabileren disulfiddefizienten Phagen aus der Bibliothek verdrängen würden. Die Bibliotheken wurden deshalb mit Mischungen von Oligodesoxyribonucleotiden ohne Cys-Codons erstellt. Zusätzlich wurde nach jeder Selektionsrunde die doppelsträngige Phagen-DNA der Bibliotheken präpariert, und die amplifizierte G3P-Bibliothek wurde mit einem Restriktionsenzym inkubiert, das bei vorhandenen Cys-Codons zur Spaltung des Fragments führte. Im Falle der randomisierten Disulfidbrücke C188-C201 wurde die entsprechende Gen-Bibliothek mit *Alw*NI, im Falle der randomisierten Disulfidbrücke C46-C53 mit *Bts*I inkubiert. Die geschnittenen Fragmente wurden durch präparative Agarosegelelektrophorese abgetrennt. Die verbleibenden Vollängen-G3P-Fragmente wurden wie unter 2.7.1 beschrieben an die einzelsträngige Matrizen-DNA (die an den Positionen der Cysteine die Codons für Ala und Leu enthielt) angelagert und zum kompletten (-)-Strang verlängert.

2.8.5 Bestimmung der Phageninfektiosität

Für die Phagen mit disulfidreduziertem Gen-3-Protein war die Bestimmung der Infektiosität im Vergleich zu Phagen mit disulfidverbrücktem G3P vor dem Hintergrund der Funktionalität des G3P von Interesse.

Wie unter 2.8.1 beschrieben wurden die entsprechenden Phagen durch Polyethylenglycol-Präzipitation aus einer *E. coli* TG1-Kultur isoliert und über einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert, um *E. coli*-Zellen aus der Phagenlösung zu entfernen. Um die relative Phagen-Konzentration bestimmen zu können, wurde die einzelsträngige Phagen-DNA isoliert und der DNA-Gehalt der verschiedenen Phagen durch Analyse der Bandenintensität im Agarosegel verglichen. Es wurden Lösungen mit gleicher Phagenkonzentration hergestellt, die für einen vergleichenden Infektionstest aller Varianten gemäß 2.8.2 verwendet wurden.

2.9 Konstruktion eines Phagen mit N-terminalem Tag am Gen-3-Protein

2.9.1 Einführen von Restriktionsstellen und Linker-Bereichen ins Phagengenom

Zur Konstruktion eines Phagen mit N-terminaler Fusion des Gastproteins wurden über *Blunt-end*-Mutagenese (2.4.3) zusätzliche *Stu*I-, *Xba*I- und *Pst*I-Erkennungssequenzen zwischen die Signalsequenz des G3P und die N1-Domäne eingebaut. Grundlage war dabei ein Phage mit stabilisiertem, disulfidverbrücktem G3P (Martin und Schmid, 2003b). Als N-terminaler Tag für die Selektion wurde zunächst ein His₆-Tag eingebaut. Restriktionsstellen und His₆-Tag wurden über die Primer fdgpa und fd His₆ b eingeführt. Der Einbau weiterer Linker zwischen His₆-Tag und *Xba*I-Schnittstelle ((HisAsp)₄-Linker und GlyLeuAspGlnGln-Linker) erfolgte ebenfalls durch *Blunt-end*-Mutagenese (Primer: fdgpa und fd Linker HD b). Der letztlich verwendete AlaCys-Tag wurde erneut durch *Blunt-end*-Mutagenese mit den Primern fdg3pCys a und fdg3pCysAla b als N-Terminus der

G3P-Sequenz eingeführt. Dabei wurde ein zusätzliches Alanin codiert, um die Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase zu optimieren.

2.9.2 Test auf Bindung der Phagen mit N-terminalem Cystein an die Trägermatrix

Puffer für Phagenisolierung:	20 mM Natrium-Acetat, pH 5,3, 0,1 mM EDTA
Bindepuffer Thiol-Sepharose:	100 mM Tris/HCl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA, 500 mM K ₂ SO ₄
Waschpuffer Thiol-Sepharose:	200 mM Acetat, 0,1 mM EDTA, 4 M GdmCl, pH 4,5
Elutionspuffer Thiol-Sepharose:	100 mM Tris/HCl, pH 9,0 ^{25 °C} , 0,1 mM EDTA, 20 mM DTT

Die Phagen mit N-terminalem Cystein wurden in *Spin-Columns* an Thiol-Sepharose 4B gebunden. Dazu wurde das Material nach Angaben des Herstellers gewaschen und in ddH₂O aufgenommen. Das Material (200 µl Material pro 50 µl Phagenlösung) wurde 3x mit je 600 µl Bindepuffer gewaschen, anschließend in 220 µl Bindepuffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 50 µl Phagenlösung gemischt. (Das EDTA wurde in diesem Fall zum Schutz vor Oxidation durch das Vorhandensein von Metallionen zugesetzt.) Die Phagen wurden wie in 2.8.1 aus einer *E. coli* TG1-Kultur isoliert (dYT, pH 7,4), am Ende jedoch zum Oxidationsschutz des Cysteins in 20 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 5,3 aufgenommen. Die Bindung erfolgte bei 35 °C über Nacht. Nach der Bindung wurden nichtgebundene Phagen durch wiederholtes Waschen des Materials in Spin-Säulen entfernt. Dazu wurde erst 5x mit Bindepuffer ohne K₂SO₄, dann 5x mit Waschpuffer und schließlich erneut 5x mit Bindepuffer ohne K₂SO₄ gewaschen. Die gebundenen Phagen wurden dann mit Elutionspuffer vom Material eluiert, wobei die Disulfidbrücke zwischen Thiol-Sepharose und Phagen mit N-terminalem Cystein mittels DTT reduziert wurde. Die Elution erfolgte in 3 Schritten mit je 200 µl Elutionspuffer, beim ersten Elutionsschritt wurde der Puffer aufgetragen und die Säule 15 min zur Elution stehen gelassen. 50 µl-Aliquots des Durchbruchs, ausgewählter Waschfraktionen und der Elutionsfraktionen wurden zur Infektion einer 450 µl-Kultur *E. coli* TG1 verwendet. Der Infektionstest wurde wie unter 2.8.2 beschrieben durchgeführt. Ausgehend von 10 µl des Infektionsansatzes wurde eine Verdünnungsreihe in Schritten von 1:10 in dYT-Medium in einer Mikrotiterplatte auf Eis erstellt. 2 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf eine Chloramphenicol-dYT-Agarplatte pipettiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus den cfu / ml konnte der Anteil gebundener Phagen bestimmt werden.

2.9.3 Erstellen einer Phagenbibliothek

Der Einbau der Gastproteine in den Phagen mit N-terminalem Cystein erfolgte durch Klonierung über die *Xba*I- und *Pst*I-Schnittstellen. Als Gastprotein wurde die β-Lactamase in das Phagen genom eingebaut. Die doppelsträngige DNA dieses Phagenkonstrukts diente als Matrize für eine fehlerbehaftete PCR mit den flankierenden Primern fdg3pN und g3p R29Wb unter den in 2.7.1 beschriebenen Bedingungen. Die β-Lactamase-Genbibliothek wurde dann an einzelsträngige DNA des Phagen-Konstrukts angelagert und mit *Pfu*-Polymerase gemäß 2.7.1 zum vollständigen (-)-Strang verlängert. Die Erstellung der Phagenbibliothek erfolgte dann gemäß 2.7.2.

2.9.4 Proteolyse zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten

Die Selektion stabilisierter Proteinvarianten wurde durch Proteolyse mit Chymotrypsin erreicht. Dazu wurde ein Ansatz für die Bindung von 100 µl Phagenlösung der Bibliothek an 440 µl Thiol-Sepharose

nach der Bindung gemäß 2.9.4 über Nacht in zwei 270 µl-Ansätze geteilt. Zum Kontrollansatz wurden zusätzlich 30 µl Puffer gegeben, im Proteolyseansatz wurde durch Zugabe von 30 µl der Protease (Endkonzentration: 0,25 µM bzw. 2,5 µM) die Proteolyse instabiler Gastproteinvarianten initiiert. Nach 15 min Proteolyse bei der entsprechenden Temperatur wurde das Material in Spin-Säulen überführt und wie unter 2.9.2 beschrieben gewaschen. Die Elution der Phagen erfolgte durch Reduktion der Disulfidbrücke zwischen Thiol-Sepharose und Phagen. Kontrolle und Proteolyseansatz wurden unter den gleichen Bedingungen parallel bearbeitet. Entsprechend 2.9.2 wurden 50 µl-Aliquots aus Durchbruch, Wasch- und Elutionsfraktionen für einen Infektionstest zur Bestimmung der Überlebensrate entnommen. Die Elutionsfraktionen des Proteolyseansatzes wurden dann vereinigt und zur Infektion einer 5 ml-Kultur von *E. coli* TG1 verwendet. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C (Infektion und Resistenzausprägung) wurden 25 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Nach mindestens 8 h Inkubation zur Phagenpropagation wurden die Phagen isoliert und die Bibliothek einer neuen Selektionsrunde unterworfen.

2.10 Klonierung selektierter Proteinvarianten

2.10.1 Amplifikation aus dem Phagen genom

Die selektierten G3P-Varianten wurden in den Expressionsvektor pET11a (Novagen) kloniert, die selektierten β -Lactamase-Varianten in den Expressionsvektor pTAC11. Dazu wurde das mutierte Genfragment aus dem Phagen genom mit einer Standard-PCR gemäß 2.4.1 amplifiziert.

Für die Gen-3-Protein-Varianten wurden Genfragmente, welche die Reste 1-217 des G3P codieren, aus der doppelsträngigen Phagen-DNA amplifiziert. Über die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurde ein C-terminaler ProSerGly(His)₆-Linker eingeführt. Für die periplasmatische Expression einiger G3P-Varianten wurde die Phagensignalsequenz über die Primer zusätzlich codiert. Die Primer enthielten die Erkennungssequenzen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI*.

Die β -Lactamase-Varianten wurden mit Primern amplifiziert, welche die β -Lactamase-Exportsequenz codieren. Die Primer enthielten in diesem Fall die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *StuI* und *XbaI*. Die PCR wurde mit *Pfu*-Polymerase nach dem angegebenen Temperaturprogramm bei einer *annealing*-Temperatur von 50 °C durchgeführt. Die Länge der Fragmente wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (1,6 %iges Gel) überprüft. Die Fragmente wurden nach 2.3.1 entsalzt und konzentriert.

2.10.2 Restriktion

NEB-Puffer 2: 10 mM Tris/HCl, pH 7,9 (25 °C), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT

Die Spaltung doppelsträngiger DNA an spezifischen, häufig palindromischen Sequenzen kann mittels Restriktionsendonukleasen erfolgen. Die amplifizierten Fragmente wurden durch Zugabe von 1/10 des Volumens an NEB-Puffer 2 (10x), 1/100 BSA (100x) und 10 U der jeweiligen Restriktionsenzyme 4 h bei 37 °C gespalten. Die folgende Reinigung des geschnittenen Inserts erfolgte gemäß 2.3.1.

Die Restriktion der Plasmid-DNA wurde unter den gleichen Bedingungen wie die des amplifizierten Fragments mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (G3P: *NdeI* / *BamHI*, β -Lactamase: *StuI* / *XbaI*) durchgeführt. Zusätzlich wurden 0,6 U/µl (EK) CIP zum Ansatz zugegeben. Die Alkalische

Phosphatase katalysiert die Abspaltung der endständigen 5'-Phosphatgruppe von der Plasmid-DNA, wodurch eine intramolekulare Religation von geschnittener Vektor-DNA verhindert wird. Die Reinigung des geschnittenen Vektors erfolgte durch präparative Agarose-Gelelektrophorese im 0,6 %igen Agarose-Gel. Das geschnittene Plasmid wurde gemäß 2.3.1 aus dem Agarose-Gel eluiert.

2.10.3 Ligation und Transformation

T4-DNA-Ligase-Puffer (10x): 250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % PEG-8000

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Hydrolyse die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Die Ligation des geschnittenen mutierten Fragments mit dem geschnittenen pET11a- bzw. pTAC11-Vektor erfolgte im 20 µl-Ansatz, der sich aus 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer, 9 µl geschnittenem Fragment, 5 µl geschnittenem Plasmid und 5 U T4-DNA-Ligase zusammensetzte. Nach mindestens 4 h Ligation bei 18 °C wurden 10 µl des Ligationsansatzes gemäß 2.6.1 mikrodialysiert und damit *E. coli* XL1B transformiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurde eine Kolonie-PCR unter den in 2.4.2 angegebenen Bedingungen mit flankierenden Primern durchgeführt. Das Zellmaterial einer Kolonie diente als *Template*-DNA im PCR-Ansatz und dem Animpfen einer 50 µl-dYT-Vorkultur.

Von den 50 µl-Vorkulturen der Kolonien mit dem gewünschten Vektor wurden ÜNKs angelegt (Inkubation bei 37 °C), die der Vektorpräparation zur Transformation des Expressionstamms. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Sequenzierung (Firma SeqLab, Göttingen, D) auf das Vorhandensein der eingeführten Mutationen überprüft. Von den Klonen mit gewünschtem Vektor wurde eine Glycerinkultur (300 µl 87 % Glycerin, 600 µl der Kultur) angelegt.

2.11 Proteinexpression und Reinigung

2.11.1 Test auf Überexpression eines Proteins

Um die Überexpression der verschiedenen G3P- bzw. β-Lactamase-Varianten zu überprüfen, wurde eine mit den zu testenden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen (G3P-Varianten) bzw. *E. coli* RB791-Zellen (β-Lactamase-Varianten) angeimpfte 5 ml-Kultur (dYT + 300 µg/ml Amp + 25 µg/ml Cm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37 °C inkubiert. 1 ml der Kultur mit OD₆₀₀ = 1 wurde abzentrifugiert, der Rest der Kultur mit 1 mM IPTG zur Induktion der Überexpression versetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt und 1 ml der Kultur mit OD₆₀₀ = 1 abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 30 µl 1x-Auftragspuffer resuspendiert und wie unter 2.2.2 beschrieben einer SDS-PAGE unterzogen. Die Überexpression konnte durch Vergleich der Intensität der Bande mit entsprechendem Molekulargewicht vor und nach Induktion festgestellt werden.

Für einen Test auf Überexpression der G3P-Konstrukte mit C-terminaler Domäne wurden verschiedene Medien getestet.

LB: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton (+/- 4 g/l Glucose)

SOB: 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2,4 g/l MgSO₄, 0,186 g/l KCl

SOC: 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 2,4 g/l MgSO₄, 0,186 g/l KCl, 4 g/l Glucose

TB: 24 g/l Hefeextrakt, 12 g/l Pepton, 9,4 g/l K₂HPO₄, 2,2 g/l KH₂PO₄ (+/- 4 g/l Glucose)

dYT: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton (+/- 4 g/l Glucose)

2.11.2 Expression und Reinigung der G3P-Varianten

2.11.2.1 Zellanzzucht, Zellaufschluß und Waschen der *inclusion bodies*

dYT-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16g/l Pepton

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM DTT

Waschpuffer: 1 mM EDTA, 1 mg/ml Desoxycholat, 20 mM DTT, pH 8,0

Die G3P-Varianten wurden cytoplasmatisch oder periplasmatisch in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die Fermentation der verschiedenen Gen-3-Protein-Varianten erfolgte im 2,5 l- bzw. 1 l-Ansatz dYT-Medium mit 300 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol. Im Falle der periplasmatischen Expression der Varianten wurde die Fermentation in 5 l dYT-Medium durchgeführt. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 (logarithmische Phase) inkubiert, dann wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG die Überexpression des Gen-3-Proteins induziert. 3 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet, bei 7 000 rpm und 4 °C 15 min lang im GS3-Rotor abzentrifugiert und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

Das Zellpellet wurde in 50 ml Lysepuffer resuspendiert; dann wurden die Zellen mit dem Mikrofluidizer aufgeschlossen und Zelltrümmer und *inclusion bodies* durch 20 min Zentrifugation im SS34-Rotor bei 11 000 rpm und 4 °C pelletiert. Alternativ wurde der Zellaufschluß durch einen Ultraschallschritt im Desintegrator (2x5 min, Intensität 0,5, Pulsbetrieb) unter Eiskühlung erreicht.

Die disulfidfreien G3P-Varianten lagen im Cytoplasma gelöst vor, bei Expression der Varianten mit Exportsequenz wurde das Protein ins Periplasma sezerniert.

Im Falle der ohne Signalsequenz klonierten disulfidverbrückten Gen-3-Protein-Varianten bildeten diese nach der Synthese Einschlusskörper (*inclusion bodies*). Das nach dem Zellaufschluß erhaltene Pellet wurde in 20 ml Waschpuffer + 0,2 mg/ml Lysozym resuspendiert und bei 15 000 rpm und 4 °C 10 min lang im SS34-Rotor zentrifugiert. Die *inclusion bodies* wurden dann noch weitere dreimal mit 15 ml Waschpuffer und anschließend dreimal mit je 15 ml Lysepuffer gewaschen und unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert.

2.11.2.2 Reduktive Entfaltung und oxidative Rückfaltung des G3P

Entfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, 6 M GdmCl, 50 mM GSH

Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA, 0,5 mM GSSG

Die *inclusion bodies* wurden nach dem Waschen zunächst in 5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA, 50 mM GSH resuspendiert und 10 min lang bei 15 000 rpm und 4 °C im SS34-Rotor abzentrifugiert, um das DTT zu entfernen. Das Pellet wurde dann in 20 ml (bzw. 15 ml) Entfaltungspuffer resuspendiert, und das Gen-3-Protein 3,5 h unter reduktiven Bedingungen entfaltet.

Die oxidative Rückfaltung des Gen-3-Proteins wurde durch 10faches Verdünnen in Rückfaltungspuffer erreicht, so daß eine Endkonzentration von 0,6 M GdmCl, 5 mM GSH und 0,5 mM GSSG vorlag. Die Rückfaltung wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Das ausgefallene Aggregat wurde bei 18 000 rpm und 4 °C 10 min lang im SS34-Rotor abzentrifugiert.

2.11.2.3 Reinigung des G3P

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM KCl

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM KCl, 500 mM Imidazol

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Kalium-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0

Die Reinigung der G3P-Varianten erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Matrix und anschließende Gelfiltrationschromatographie.

Dazu wurde die Proteinlösung zur Komplexierung des im Puffer enthaltenen EDTA mit Mg^{2+} versetzt und in 10 mM Imidazol auf eine mit Ni-NTA-Puffer A äquilibrierte Säule mittels einer P1-Pumpe mit einer Flußrate von 3 ml/min aufgetragen. Nichtbindende Proteine wurden durch Waschen mit 20 mM Imidazol bei einer Flußrate von 2,5 ml/min eluiert. Das G3P wurde durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration auf 250 mM bei einer Flußrate von 2,5 ml/min eluiert. Eventuell noch gebundene Proteine wurden durch Erhöhen der Imidazol-Konzentration auf 500 mM von der Säule gewaschen.

Die G3P-haltigen Fraktionen aus der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 prep grade-Säule aufgetragen (Flußrate 1,7 ml/min). Nach 25,5 ml Elutionsvolumen (15 min nach dem Auftragen des Proteins) wurde mit dem Sammeln von 1,7 ml-Fraktionen begonnen.

Die vereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration wurden gegen 5l 15 mM und anschließend gegen 5 l 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert und lyophilisiert. Das getrocknete Protein wurde bei -20 °C gelagert.

2.11.3 *Expression und Reinigung der G3P-Konstrukte mit C-terminaler Domäne*

2.11.3.1 G3P N1N2CT

Für die Expression des G3P mit C-terminaler Domäne (G3P* N1N2CT) wurde das Genfragment, das die Reste 1-407 codiert, in einer Standard-PCR (2.4.1) aus der doppelsträngigen Phagen-DNA amplifiziert. Es handelte sich um die bereits stabilisierte Variante des G3P mit vier stabilisierenden Mutationen in den beiden N-terminalen Domänen (Martin und Schmid, 2003b) und einem verkürzten *Linker* zwischen N2- und CT-Domäne (zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle und Deletion der Reste V231-G256). Das Fragment wurde über die Restriktionsenzyme *NheI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pET 11a kloniert (gemäß 2.10). Das G3P wurde in *E. coli* BL21 (DE3) gemäß 2.11.2.1 überexprimiert (Medium: dYT + 4 g/l Glucose) und die Zellen aufgeschlossen. Das Protein lag in Form von *inclusion bodies* vor. Diese wurden wie für das N1N2-Fragment beschrieben (2.11.2) gewaschen entfaltet, rückgefaltet und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltrationschromatographie gereinigt.

2.11.3.2 Isolierte C-terminale Domäne des G3P

Das codierende Genfragment für die C-terminale Domäne (Reste 256-407) wurde in einer PCR (2.4.1) aus doppelsträngiger Phagen-DNA amplifiziert und als *NheI* / *BamHI*-Fragment in den Expressionsvektor pET11a kloniert. Die CT-Domäne wurde in *E. coli* BL21 (DE3) gemäß 2.11.2.1 als cytoplasmatisch gelöstes Protein überexprimiert (Medium dYT + 4 g/l Glucose) und wurde wie das N1N2-Fragment über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt.

2.11.3.3 G3P N2CT

Rückfaltungspuffer:	0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM GSSG, 0,5 M Arginin, pH 10,4
Anionenaustausch-Puffer A:	20 mM Tris/HCl, pH 7,7
Anionenaustausch-Puffer B:	20 mM Tris/HCl, pH 7,7, 1 M NaCl
Gelfiltrationspuffer:	20 mM Kalium-Phosphat, 100 mM KCl, pH 7,0

Für die Expression der N2-Domäne in Kombination mit der CT-Domäne wurde das Genfragment für die Aminosäuren 102-407 aus der doppelsträngigen Phagen-DNA amplifiziert. Die N2-Domäne enthielt drei stabilisierende Mutationen (eine im globulären Teil, zwei in der Gelenk-Subdomäne) (Martin und Schmid, 2003b) und den in 2.11.3.1 erwähnten verkürzten *Linker* zwischen N2 und CT. Das Fragment wurde über die Restriktionsenzyme *NheI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pET11a kloniert und in *E. coli* BL21 (DE3) in 5 l dYT-Medium mit Glucose (4 g/l) überexprimiert (2.11.2.1). Das Protein lag im Cytoplasma in Form von *inclusion bodies* vor. Nach dem Waschen der *inclusion bodies* wurden diese in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 6 M GdmCl aufgenommen. Die Rückfaltung wurde durch 1:10-Verdünnung in Rückfaltungspuffer unter Zusatz von 0,5 M Arginin erreicht. Der Rückfaltungsansatz wurde gegen 20 mM Tris/HCl, pH 7,7 dialysiert und mittels P1-Pumpe auf eine mit Puffer A äquilibrierte Fractogel EMD TMAE-650 (M)-Säule bei einer Flußrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 auf 1 M NaCl innerhalb von 90 min. Eventuell noch gebundene Proteine wurden mit 1 M NaCl von der Säule entfernt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.2) auf die Gegenwart von G3P N2CT untersucht. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und in 5 ml-Aliquots auf einer mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierten HiLoad Superdex 75 prep grade-Säule aufgetrennt (Flußrate 1,7 ml/min). Die Fraktionen wurden über SDS-PAGE und Messung von Absorptionsspektren auf das Vorhandensein von G3P N2CT überprüft. G3P N2CT eluiert bei 40-57 ml. Die Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert, schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.11.4 Expression und Reinigung der β -Lactamase-Varianten

2.11.4.1 Zellanzucht und Periplasmaaufschluß

LB-Medium:	5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton
Lysepuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM DTT

Die β -Lactamase-Varianten wurden periplasmatisch in *E. coli* RB791 exprimiert. Die Fermentation erfolgte in 5 l LB-Medium unter Zusatz von 300 μ g/ml Ampicillin. Die Kultur wurde bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert, dann wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG die Überexpression der β -Lactamase induziert. Nach Induktion über Nacht bei 25 °C wurden die Zellen geerntet, bei 7000 rpm und 4 °C 15 min lang im GS3-Rotor abzentrifugiert und das Zellpellet bei -80 °C eingefroren. Der Periplasmaaufschluß erfolgte durch Lysozymbehandlung. Dazu wurde das Zellpellet in 50 ml Lysepuffer aufgenommen und mit 0,2 mg/ml Lysozym und unter Zusatz von DNaseI 60 min lang auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C für 30 min wurde der Überstand mit 0,4 % Polyethylenimin versetzt und 15 min auf Eis gerührt, um DNA zerstörter Zellen zu präzipitieren. Nach

erneuter 30minütiger Zentrifugation wurde der Überstand über Nacht gegen 20 mM Tris/HCl, pH 7,7 dialysiert (Erniedrigung der physiologischen Salzkonzentration).

2.11.4.2 Reinigung der β -Lactamase-Varianten

Anionenaustausch-Puffer A:	20 mM Tris/HCl, pH 7,7
Anionenaustausch-Puffer B:	20 mM Tris/HCl, pH 7,7, 1 M NaCl
Anionenaustausch-Puffer C:	20 mM MES, pH 6,0
Anionenaustausch-Puffer D:	20 mM MES, pH 6,0, 1M NaCl
Gelfiltrationspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,7

Die Reinigung der β -Lactamase-Varianten erfolgte durch Anionenaustausch-Chromatographie bei verschiedenen pH-Werten und anschließende Gelfiltrationschromatographie.

Das Dialysat (2.11.4.1) wurde mit Anionenaustausch-Puffer A auf das doppelte Volumen verdünnt und mittels P1-Pumpe auf eine mit Puffer A äquilibrierte Fractogel EMD TMAE-650 (M)-Säule bei einer Flußrate von 5 ml/min aufgetragen. Nach 60minütigem Waschen wurden gebundene Proteine durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0-0,2 M NaCl in 90 min eluiert (β -Lactamase eluiert bei etwa 100 mM NaCl). Noch gebundene Proteine wurden mit 1 M NaCl von der Säule gewaschen. Die Fraktionen wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.2) und durch Aktivitätstest mit Nitrocefin auf das Vorhandensein von β -Lactamase untersucht. Die β -Lactamase-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer C dialysiert. Die Proteinlösung wurde dann auf eine in Puffer C äquilibrierte Fractogel EMD TMAE-650 (M)-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte erneut mit einem linearen Gradienten von 0-0,2 M NaCl. Die β -Lactamase wurde anhand von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und mittels Nitrocefin-Aktivitätstest identifiziert, die Fraktionen wurden vereinigt und in 5 ml-Aliquots auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte HiLoad Superdex 75 prep grade-Säule aufgetragen (Flußrate 1,7 ml/min). Die β -Lactamase-haltigen Fraktionen (Elutionsvolumen 66 ml) wurden vereinigt, schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.12 Aktivitätstest der β -Lactamase-Varianten

Die Aktivität der β -Lactamase-Varianten wurde durch Spaltung des chromophoren Cephalosporin-Derivats Nitrocefin gemessen. Das Maximum des Differenzspektrums von ungespaltenem und gespaltenem Nitrocefin liegt bei 486 nm. Aktivitätsmessungen wurden an einem HP8452 Dioden-Array-Spektrophotometer mit Peltier-Element (HP 89090A) mit 2,5 nM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 1 mM EDTA, pH 7,0 und Zugabe von 20-100 μ M Nitrocefin bei Temperaturen von 25-70 °C durchgeführt (Gesamtvolumen: 1 600 μ l). Das Protein wurde 5 min im Puffer bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Spaltungsreaktion wurde dann durch Zugabe des ebenfalls temperierten Nitrocefins gestartet. Die Reaktion wurde 2 min lang anhand der Absorption bei 486 nm verfolgt. Für jede Temperatur wurde die Anfangssteigung der Reaktion bestimmt. Da die Aktivitätsmessungen nicht unter Substratsättigung durchgeführt wurden ($K_M = 46 \mu$ M für Wildtyp- β -Lactamase), ist nur eine qualitative Auswertung der Ergebnisse möglich. Die Aktivität des Wildtyp-Proteins und der stabilisierten β -Lactamase-Variante bei 25 °C wurde zusätzlich nach Denaturierung bei 60 °C für unterschiedliche Zeiten verglichen. Die Messungen erfolgten mit 2,5 nM Protein und

100 μM Nitrocefin unter den angegebenen Bedingungen. Es wurde die Abhängigkeit der Anfangssteigungen (Aktivität in A_{486}/s) von der Denaturierungszeit bei 60 °C bestimmt.

Der Aktivitätstest wurde ebenfalls mit β -Lactamase als Fusionsprotein mit dem G3P im Phagen gemessen. Dazu wurden aus einer *E. coli* TG1-Kultur Phagen wie unter 2.8.1 beschrieben frisch präpariert und 50 μl der Präparation in einen Aktivitätstest unter den obigen Bedingungen eingesetzt. Die Absorptionsänderung bei 486 nm wurde aufgrund der sehr niedrigen β -Lactamase-Konzentration in diesen Ansätzen ($\sim 10^{-15}$ M) 20 min lang.

2.13 Proteolyse der G3P-Konstrukte

Entfaltete Proteine sind für Proteasen gut zugänglich, wohingegen gefaltete Proteine resistenter gegenüber Proteolyse sind. Chymotrypsin spaltet nach aromatischen und großen hydrophoben Aminosäuren, die in gefalteten Proteinen im Inneren verborgen sind. Bei Entfaltung sind die Reste für die Protease zugänglich, so daß die Peptidbindungen gespalten werden können.

Die verschiedenen G3P-Konstrukte wurden einer Proteolyse mit Chymotrypsin unterworfen, um zu überprüfen, ob die C-terminale Domäne gefaltet vorliegt. Im Vergleich zum N1N2-Fragment, das bei 25 °C gefaltet vorliegt, und der reduzierten, carboxymethylierten Form der RNase T1 (RCM-RNase T1) (als ein Beispiel für ein Protein, das bei 25 °C entfaltet vorliegt) wurden die Konstrukte G3P N1N2CT, G3P N2CT und die isolierte CT-Domäne bei 25 °C mit Chymotrypsin inkubiert. In 320 μl -Ansätzen wurden 11 μM isolierte CT-Domäne, 10 μM N2-CT, 12 μM N1N2, 8 μM N1N2CT und 20 μM RCM-RNase T1 mit 0,2 μM Chymotrypsin (2,8 μl einer 25 μM Stammlösung) inkubiert (Protein: Protease = 50:1 (w/w)). Nach unterschiedlichen Zeiten wurden 36 μl -Aliquots entnommen, mit 12 μl Roti-Load-Probenpuffer versetzt und schockgefroren. Die Analyse der Proteolyse erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.2).

2.14 Spektroskopische Charakterisierung

2.14.1 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung

UV-Absorptionsspektren wurden in einem Kontron Uvikon 860 Absorptionsspektrometer oder in einem Cary 100 Bio UV-VIS-Spektrophotometer im Bereich zwischen 240 und 350 nm aufgenommen. Vorhandenes Aggregat wurde durch Gelfiltrationschromatographie über eine NAP-10-Säule und anschließende Zentrifugation der Proteinlösung abgetrennt. Die Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke mit dem entsprechenden Puffer als Referenz gemessen. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 50 nm/min bei einer Bandbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm. Die Konzentration der Proteinlösung wurde anhand der Absorption bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Die molaren Absorptionskoeffizienten bei 280 nm (ϵ_{280}) wurden aus den tabellierten Werten der freien Aminosäuren in 6 M GdmCl berechnet, wobei die Beiträge der chromophoren Aminosäuren addiert werden (Gill & von Hippel, 1989). Für das stabilisierte Gen-3-Protein wurde ein Absorptionskoeffizient von 43 400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das N1N2-Fragment verwendet, für die isolierte N1-Domäne 21 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. ϵ_{280} des stabilisierten disulfidfreien G3Ps betrug 49 850 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, und der Absorptionskoeffizient der β -Lactamase betrug 30 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für die Konstrukte mit C-terminaler Domäne wurden die folgenden Absorptionskoeffizienten für Konzentrationsbestimmungen verwendet:

N1N2CT: 51 400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, N2CT: 27 690 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, CT: 9 080 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.14.2 Circular dichroismus-Spektren

Nah- und Fern-UV-Circular dichroismus-Spektren wurden an einem Jasco J-600 Spektropolarimeter in temperierbaren Quarzküvetten aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 4 μM für Fern-UV-CD-Spektren und 10 μM für Nah-UV-Spektren, wobei in 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 gemessen wurde. Nah-UV-Spektren (250-320 nm) wurden bei einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen, Fern-UV-Spektren (190-250 nm) bei einer Schichtdicke von 1 mm. Die Aufnahme- geschwindigkeit betrug 20 nm/min bei einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 1 s. Von acht gemittelten Spektren wurde das Pufferspektrum subtrahiert und mit Gleichung 2.1 die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure berechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}}} \quad \text{Gl. 2.1}$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$: mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest in $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$; Θ : gemessene Elliptizität in Grad; c : molare Konzentration des Proteins; d : Schichtdicke in cm; N_{AS} : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins

2.14.3 Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzemissionsspektren wurden an einem Hitachi F-4010 oder an einem Jasco FP-6500-Spektralfluorimeter bei 25 °C (G3P, β -Lactamase) bzw. 35 °C (G3P) gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 1 μM in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 (G3P N1, N1N2 und G3P-Konstrukte mit C-terminaler Domäne). Die Spektren wurden mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 120 nm/min und einer Dämpfung von 0,5 s aufgenommen. Die Anregungsbandbreite betrug 5 oder 3 nm (abhängig von der Lichtintensität), die Emissionsbandbreite betrug 10 nm. Emissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm im Bereich von 300-450 nm aufgenommen, bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm im Bereich von 305-450 nm. Die Spektren wurden durch Subtraktion des Pufferspektrums um Pufferfluoreszenz und Ramanpeak des Wassers korrigiert.

2.14.4 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteine

Varianten der G3P N1N2-Konstrukte und der β -Lactamase wurden durch Massenspektrometrie überprüft. Die Proben wurden über eine NAP-10-Säule entsalzt und in 15 mM Ammoniumacetat umgepuffert (flüchtiger, protonenhaltiger Puffer, der die Ionisation fördert). Proben mit einer Proteinkonzentration von 5-20 μM wurden an einem Micromass LCT, *electrspray ionization, time of flight* (ESI-TOF) Massenspektrometer gemessen. Positiv geladene Ionen wurden im ES^+ -Modus detektiert (Capillary 3 200 V, Sample Cone 60 V, Extraction Cone 3 V, RF Lens 200 V, Desolvation Temperature 150 °C, Source Temperature 120 °C).

Aus den Spektren wurden für jeden Ladungszustand die m/z -Werte mit der höchsten Ionenintensität bestimmt. Gemäß Gleichung 2.2 wurde die Molare Masse M des Proteins bestimmt und mit der berechneten Durchschnittsisotopenmasse (berechnet mit dem ExPASy Server) verglichen.

$$M = (m/z - 1) \cdot z \quad \text{Gl. 2.2}$$

M : molekulare Masse, m/z : gemessener Quotient Masse/Ladung eines mehrfach geladenen Ions, z : Ladung

2.15 Bestimmung der konformationellen Proteinstabilität

2.15.1 Thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge

Die Bestimmung der thermischen Stabilität der G3P- und β -Lactamase-Varianten erfolgte durch Messung thermischer Entfaltungsübergänge mit verschiedenen Sonden. Die Entfaltung wurde mittels Circular dichroismus (Fern-UV), Absorption und Kalorimetrie verfolgt.

2.15.1.1 Circular dichroismus

Die Messung thermisch-induzierter Entfaltungsübergänge erfolgte in einem Jasco J-600 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltier-Element bei einer Proteinkonzentration von 4 μ M in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 (G3P-Varianten) bzw. in 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 (β -Lactamase-Varianten) und einer Heizrate von 60 K h⁻¹.

Die thermische Entfaltung der G3P-Varianten wurde anhand der Abnahme des CD-Signals bei 230 nm verfolgt. Bei dieser Wellenlänge kann sowohl die Entfaltung der N1-Domäne als auch die Entfaltung der N2-Domäne verfolgt werden. Die Messung bei 210 nm ermöglicht die selektive Betrachtung der Entfaltung von N2. Die Übergänge wurden bei einer Bandbreite von 1 nm, einer Dämpfung von 8 s und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Auswertung der thermischen Entfaltungsübergänge bei 230 nm erfolgte unter Annahme eines Dreizustandsmodells (Beasty *et al.*, 1986), das eine gekoppelte Monomerisierung und Entfaltung beschreibt, und unter Festsetzung der Änderung der Wärmekapazitäten ΔC_p auf 1 000 J·mol⁻¹·K⁻¹ (N1) bzw. 10 000 J·mol⁻¹·K⁻¹ (N2) (2.15.3.3).

Die thermischen Übergänge des G3P bei 210 nm wurden unter Annahme eines Zweizustandsmodells ausgewertet. Die Änderung der Wärmekapazität wurde auf 10 000 J·mol⁻¹·K⁻¹ festgelegt.

Die thermische Entfaltung der β -Lactamase-Varianten wurde anhand der Zunahme des CD-Signals bei 223 nm verfolgt. Die Übergänge wurden bei einer Bandbreite von 1 nm, einer Dämpfung von 8 s und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells unter Festsetzung der Änderung der Wärmekapazität ΔC_p auf 30 000 J·mol⁻¹·K⁻¹ (2.15.1.4).

Um die Abhängigkeit der thermodynamischen Stabilität einiger β -Lactamase-Varianten von der Salzkonzentration zu bestimmen, wurden thermisch-induzierte Entfaltungsübergänge von 3 μ M Protein in Gegenwart von 0-1,6 M NaCl in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 unter den bereits genannten Bedingungen gemessen und wie beschrieben analysiert. Die genaue NaCl-Konzentration der Lösung wurde dabei aus der Differenz der Brechungsindices der Proteinlösung und des Phosphat-Puffers ohne NaCl (Δn) nach Gleichung 2.3 bestimmt.

$$[\text{NaCl}] = 105,74 \cdot \Delta n - 89,37 \cdot (\Delta n)^2 + 7259 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2.3}$$

2.15.1.2 Absorption

Die Messung der thermischen Entfaltung der Proteinvarianten über die Absorption wurde in einem HP8452-Diodenarray-Spektrophotometer durchgeführt. Die Entfaltung wurde über die Absorption bei 286 nm, 292 nm und 296 nm verfolgt. Bei 286 nm wird die Tyrosinabsorption betrachtet, bei 292 nm und 296 nm sollten beide Chromophore zur beobachteten Absorption beitragen. Die Übergänge

wurden bei Proteinkonzentrationen von 7-10 μM in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0 (G3P) und 1 cm Schichtdicke gemessen.

2.15.1.3 Kalorimetrie (DSC)

DSC-Messungen wurden an einem VP-DSC Mikrokolorimeter bei Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 181 μM in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 (G3P) bzw. 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 (β -Lactamase) mit einer Heizrate von $1,5 \text{ K min}^{-1}$ durchgeführt (Zellvolumen 0,523 ml). Die gemessene molare Wärmekapazität wurde nach der Levenberg-Marquardt-Methode für mehrere unabhängige Domänen ausgewertet (Gleichung 2.4). Hierbei wird ein Nicht-Zweizustandsmodell angenommen, die Daten werden um den Pufferwert korrigiert (Annahme von $\Delta C_p = 0$). Die Analyse wurde mit dem Programm Origin 5.0 durchgeführt. DSC-Messungen wurden sowohl mit G3P-Varianten als auch mit β -Lactamase-Varianten durchgeführt.

$$C_p(T) = \frac{K_A(T) \cdot \Delta H_{A,cal} \cdot \Delta H_{A,vH}}{(1 + K_A(T))^2 \cdot RT^2} + \dots \quad \text{Gl. 2.4 a}$$

$$K_A(T) = \exp \left\{ -\frac{\Delta H_{A,vH}}{RT} \cdot \left(1 - \frac{T}{T_A} \right) \right\} \quad \text{Gl. 2.4 b}$$

$C_p(T)$: Änderung der Wärmekapazität; $\Delta H_{A,vH}$: van't Hoff-Enthalpie von Domäne A; $\Delta H_{A,cal}$: kalorimetrische Enthalpie von Domäne A; R : allgemeine Gaskonstante

2.15.1.4 Auswertung thermisch-induzierter Entfaltungsübergänge

a. Auswertung gemäß dem Dreizustandsmodell (Beasty *et al.*, 1986)

Für das Dreizustandsmodell gilt für die Gleichgewichtskonstanten Gl. 2.5.



$$K_1 = \frac{[I]}{[N]}, \quad K_2 = \frac{[U]}{[I]} \quad \text{Gl. 2.5 a}$$

K_1 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von N nach I; K_2 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von I nach U; N: natives Protein; I: Intermediat; U: entfaltetes Protein

Das Gesamtprotein P setzt sich aus den Anteilen des nativen Proteins (N), des Intermediats (I) und des denaturierten Proteins (U) zusammen (Gleichung 2.6). Die Kombination mit Gleichung 2.5 a ergibt für die Berechnung des Anteils des denaturierten Proteins U Gleichung 2.7.

$$[P] = [N] + [I] + [U] \quad \text{Gl. 2.6}$$

$$[U] = \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot [P]}{K_1 \cdot K_2 + K_1 + 1} \quad \text{Gl. 2.7}$$

K_1 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von N nach I; K_2 : Gleichgewichtskonstante des Übergangs von I nach U; N: Anteil natives Protein; I: Anteil Intermediat; U: Anteil entfaltetes Protein

Der apparente Anteil des denaturierten Proteins y_{app} ergibt sich aus der Summe der Anteile des denaturierten Proteins (X_U) und des Intermediats (X_I) (Gleichung 2.8), wobei z die optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem denaturierten Zustand angibt.

$$y_{\text{app}} = [X_U] + z \cdot [X_I], \quad [X_U] = \frac{[U]}{[P]}, \quad [X_I] = \frac{[U]}{K_2 \cdot [P]} \quad \text{Gl. 2.8}$$

Kombination der Gleichungen 2.5-2.8 ergibt Gleichung 2.9, welche die Entfaltung anhand der Meßgröße $y(T)$ in Abhängigkeit von der Temperatur beschreibt.

Die Berechnung der Schmelztemperaturen für die beiden Domänen des Gen-3-Proteins sowie der van't Hoff-Enthalpien erfolgte gemäß Gleichung 2.9. Die Auswertung durch nicht-lineare Regression unter Verwendung von Gleichung 2.9 wurde mit dem Programm Graft 3.0 (Erithacus, Staines, UK) durchgeführt.

$$y(T) = y_N^0 + m_N \cdot T + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot (y_U^0 + m_U \cdot T - (y_N^0 + m_N \cdot T)) \quad \text{Gl. 2.9}$$

$$K_1 = \exp \left(-\frac{\Delta H_{m,1}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{m,1}} \right) - \frac{\Delta C_{p,1}}{R} \cdot \left(1 - \frac{T_{m,1}}{T} + \ln \frac{T_{m,1}}{T} \right) \right)$$

$$K_2 = \exp \left(-\frac{\Delta H_{m,2}}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{m,2}} \right) - \frac{\Delta C_{p,2}}{R} \cdot \left(1 - \frac{T_{m,2}}{T} + \ln \frac{T_{m,2}}{T} \right) \right)$$

$y(T)$: Meßgröße, gemessene Elliptizität in Grad; y_N , y_U : Signal des gefalteten (N) und entfaltenen (U) Proteins, wobei y^0 jeweils auf $T = 0$ K extrapolierte Werte angibt; m_N , m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $T_{m,1}$, $T_{m,2}$: Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs der N1- ($T_{m,1}$) bzw. der N2-Domäne ($T_{m,2}$); $\Delta H_{m,1}$, $\Delta H_{m,2}$: van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei $T_{m,1}$ bzw. $T_{m,2}$; $\Delta C_{p,1}$, $\Delta C_{p,2}$: Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins der N1- ($\Delta C_{p,1}$) bzw. der N2-Domäne ($\Delta C_{p,2}$), z : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfaltenen Zustand; T : Temperatur in K; R : allgemeine Gaskonstante

Mit den aus Gleichung 2.9 erhaltenen Werten für den Übergangsmittelpunkt T_m und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_m der verschiedenen Domänen ließ sich mit Gleichung 2.10 die konformationelle Stabilität ΔG_D des Proteins bestimmen.

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_m \cdot \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \cdot \left[T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad \text{Gl. 2.10}$$

ΔG_D : freie Enthalpie des thermischen Übergangs (konformationelle Stabilität des Proteins); ΔH_m : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei T_m ; T_m : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs; ΔC_p : Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins

b. Auswertung gemäß dem Zweizustandsmodell

Gemäß der Annahme eines Zweizustandsmodells stehen der native Zustand und der denaturierte Zustand ohne das Auftreten von Intermediaten im Gleichgewicht. Die Gleichgewichtskonstante K_U der Entfaltungsreaktion kann dabei aus einer physikalischen Eigenschaft y bestimmt werden (Gleichung 2.11). ΔG_U kann dann mit Gleichung 2.12 bestimmt werden.

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{(y_N - y_{\text{obs}})}{(y_{\text{obs}} - y_U)} \quad \text{Gl. 2.11}$$

$$\Delta G_D = -RT \cdot \ln K_U \quad \text{Gl. 2.12}$$

K_U : Gleichgewichtskonstante der Entfaltungsreaktion; $y_{N,U}$: physikalische Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins, y_{obs} : Meßgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U, ΔG_D : freie Enthalpie der Entfaltung, R : allgemeine Gaskonstante, T : Temperatur in K

Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_U wurde durch Integration des Enthalpie- und des Entropieterms zwischen T_m und T erhalten (Gleichung 2.13). Die lineare Änderung der Meßgröße des nativen und entfalteten Proteins ist in Gleichung 2.14 ausgedrückt.

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_U(T_m) \cdot \frac{T_m - T}{T_m} - \Delta C_p \cdot \left[T_m - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad \text{Gl. 2.13}$$

$$y_{N,U} = y_{N,U}^0 + m_{N,U} \cdot T \quad \text{Gl. 2.14}$$

$\Delta G_U(T)$: freie Enthalpie des thermischen Übergangs (konformationelle Stabilität des Proteins); ΔH_U : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung bei T_m ; T_m : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs; ΔC_p : Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins

Die Berechnung des Mittelpunkts des thermischen Übergangs (T_m) und der van't Hoff-Enthalpie erfolgte mittels Gleichung 2.15 durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Grafit 3.0 (Erithacus, Staines, UK).

$$y(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot T + (y_U^0 + m_U \cdot T) \cdot e^{\left\{ \frac{\Delta H_U(T_m)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_m}{T} + \ln \left(\frac{T_m}{T} \right) \right] \right\}}}{1 + e^{\left\{ \frac{\Delta H_U(T)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{\Delta C_p}{R} \left[1 - \frac{T_m}{T} + \ln \left(\frac{T_m}{T} \right) \right] \right\}}} \quad \text{Gl. 2.15}$$

$y(T)$: Meßgröße, gemessene Elliptizität in Grad; y_N , y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils auf $T = 0$ K extrapolierte Werte angibt; m_N , m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; T_m : Temperatur am Mittelpunkt des Übergangs; ΔH_U : van't Hoff-Enthalpie der Entfaltung T_m ; ΔC_p : Differenz der molaren Wärmekapazitäten des denaturierten und nativen Proteins; T : Temperatur in K; R : allgemeine Gaskonstante

Die konformationelle Stabilität des Proteins ließ sich mit den aus Gleichung 2.15 (Privalov, 1993) erhaltenen Werten für den Übergangsmittelpunkt T_m und die van't Hoff-Enthalpie ΔH_U mit Gleichung 2.10 berechnen. Die Annahme eines Zweizustandsmodells für die β -Lactamase als Zwei-Domänen-Protein ist eine Vereinfachung, die einen Vergleich der Varianten ermöglichen soll. Die berechneten thermodynamischen Parameter sind nicht korrekt, sondern nur qualitativ zu bewerten.

2.15.2 Konzentrationsbestimmung von GdmCl, GdmSCN und Harnstoff

Die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung der Proteinvarianten für Stabilitätsuntersuchungen wurde mit GdmCl, GdmSCN oder Harnstoff als Denaturierungsmittel durchgeführt. Die Konzentration des Denaturierungsmittels wurde aus der Differenz der Brechungsindices des Puffers in Gegenwart und Abwesenheit des Denaturierungsmittels berechnet (Gleichung 2.16 – 2.18) (Pace, 1986).

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot (\Delta n)^2 - 91,6 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2.16}$$

$$[\text{GdmSCN}] = 40,4 \cdot \Delta n \quad \text{Gl. 2.17}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66 \cdot \Delta n + 29,753 \cdot (\Delta n)^2 + 185,56 \cdot (\Delta n)^3 \quad \text{Gl. 2.18}$$

[GdmCl]: GdmCl-Konzentration in mol/l; [GdmSCN]: GdmSCN-Konzentration in mol/l; [Harnstoff]: Harnstoff-Konzentration in mol/l; Δn : Differenz der Brechungsindices der Lösungen mit und ohne Denaturierungsmittel

2.15.3 Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltungsübergänge

Die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung der Proteinvarianten wurde mit den Meßsonden Fluoreszenz und Circular dichroismus verfolgt.

2.15.3.1 Fluoreszenz als Messsonde für Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung

Fluoreszenz wurde als Meßsonde für die Entfaltung von G3P- und β -Lactamase-Varianten verwendet. Die Stabilitätsmessungen von G3P-Varianten erfolgten in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C bzw. 35 °C, die Stabilität von β -Lactamase-Varianten wurde in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C bestimmt. Die Entfaltung wurde bei den G3P-Varianten durch GdmCl bzw. GdmSCN induziert, bei den β -Lactamase-Varianten wurden GdmCl und Harnstoff verwendet. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten an einem Hitachi F-4010- bzw. an einem Jasco FP-6500-Spektrometer in einem Volumen von 1 700 μ l bzw. 1 000 μ l in Fluoreszenzrührküvetten. Die Bandbreiten des Anregungslichts betrugen 3 bzw. 5 nm, die des Emissionslichts 10 nm bei einer Dämpfung von 2 s. Die Proteinkonzentration betrug für die G3P-Varianten 0,5 μ M, für die β -

Lactamase-Varianten 0,35 μM . Die Feststellung der genauen Denaturierungsmittelkonzentrationen der Meßlösungen erfolgte durch Bestimmung der Brechungsindices Δn für Puffer mit und ohne Denaturierungsmittel nach Gleichung 2.16-2.18 (Pace, 1986). Die Meßwerte wurden um die Pufferfluoreszenz korrigiert.

Im Falle der G3P-Varianten wurden Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz als Sonden für die Entfaltung verwendet. Aufgrund der ungleichen Verteilung der Fluorophore auf die Domänen des G3P kann im N1N2-Fragment durch Beobachtung der Tyrosinfluoreszenz (Anregung: 280 nm, Emission: 310 nm) hauptsächlich die N2-Domäne, durch Beobachtung der Tryptophanfluoreszenz (Anregung: 295 nm, Emission: 360 nm) hauptsächlich die N1-Domäne betrachtet werden. Die Entfaltung der β -Lactamase-Varianten wurde mittels Tryptophanfluoreszenz verfolgt (Anregung: 280 nm, Emission: 340 nm). Die Auswertung der Entfaltungsübergänge erfolgte für die getrennten Domänen des G3P gemäß einem Zweizustandsmodell, für die stabilisierten disulfidfreien G3P-Varianten gemäß einem Dreizustandsmodell (2.15.3.3).

2.15.3.2 CD als Meßsonde für Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung

Im Falle der β -Lactamase-Varianten wurde die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung auch mittels CD verfolgt. 0,35 μM Protein wurden in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C gemessen. Die Messung bei 220 nm erfolgte bei einer Schichtdicke von 1 cm, einer Bandbreite von 1 nm und einer Dämpfung von 8 s. Die Auswertung erfolgte bei hochkooperativen Übergängen gemäß einem Zweizustandsmodell, sonst gemäß einem Dreizustandsmodell (2.15.3.3).

2.15.3.3 Auswertung Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltungsübergänge

Die experimentellen Daten aus CD- und Fluoreszenzmessungen wurden unter Annahme der Gültigkeit des Zwei-Zustands-Modells für die getrennten Übergänge der N1 und der N2-Domäne des G3P und für die hochkooperativen Entfaltungsübergänge der β -Lactamase ausgewertet, wobei das lineare Extrapolationsmodell angenommen wurde, welches die lineare Abhängigkeit der Proteinstabilität von der Denaturierungsmittelkonzentration beschreibt (Gleichung 2.19).

$$\Delta G_D = \Delta G_D(\text{H}_2\text{O}) + m \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2.19}$$

$\Delta G_D(\text{H}_2\text{O})$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels, m : Kooperativität des Entfaltungsübergangs, $[\text{D}]$: Denaturierungsmittel-Konzentration

Für die spektroskopischen Eigenschaften von N und U wird ebenfalls eine lineare Abhängigkeit vom Denaturierungsmittel gemäß Gleichung 2.20 angenommen.

$$y_{\text{N,U}} = y_{\text{N,U}}^0 + m_{\text{N,U}} \cdot [\text{D}] \quad \text{Gl. 2.20}$$

$y_{\text{N,U}}^0$: spektroskopische Eigenschaft des nativen bzw. entfalteten Proteins in Abwesenheit von Denaturierungsmittel, $m_{\text{N,U}}$: Steigung der Basislinie des nativen bzw. denaturierten Proteins

Die Kombination der Gleichungen 2.11, 2.12, 2.19 und 2.20 ergibt nach Santoro und Bolen (1988) Gleichung 2.21, welche die Entfaltung anhand der Meßgröße y_{obs} in Abhängigkeit von der

Konzentration des Denaturierungsmittels beschreibt. Die Parameter wurden mit dem Programm Grafit 3.0 (Erithacus, Staines, UK) durch nicht-lineare Regression an die experimentellen Daten angeglichen.

$$y_{\text{obs}}([D]) = \frac{y_N^0 + m_N[D] + (y_U^0 + m_U[D]) \cdot e^{\frac{-\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) + m[D]}{RT}}}{1 + e^{\frac{-\Delta G_U(\text{H}_2\text{O}) + m[D]}{RT}}} \quad \text{Gl. 2.21}$$

y_{obs} : Meßgröße bei Vorliegen einer Mischung von N und U; y_N , y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils auf $T = 0 \text{ K}$ extrapolierte Werte angibt; m_N , m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $[D]$: Denaturierungsmittel-Konzentration; $\Delta G_U(\text{H}_2\text{O})$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels; R : allgemeine Gaskonstante; T : Temperatur in K

Sowohl für die Entfaltungsübergänge der stabilisierten disulfidfreien G3P-Varianten als auch für die GdmCl-induzierten Übergänge der β -Lactamase-Varianten konnte ein biphasischer Verlauf der Entfaltungsübergänge beobachtet werden. Diese Übergänge wurden gemäß einem Dreizustandsmodell ausgewertet. Das Modell basiert auf einer gekoppelten Monomerisierung und Entfaltung nach Beasty *et al.* (1986).

Für die Entfaltung gelten damit die Gleichungen 2.5 - 2.8. Für die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung ergibt sich daraus Gleichung 2.22.

$$y(D) = y_N^0 + m_N \cdot [D] + \frac{1}{1 + K_2 + \frac{1}{K_1}} \cdot (K_2 + z) \cdot (y_U^0 + m_U \cdot [D] - (y_N^0 + m_N \cdot [D])) \quad \text{Gl.2.22}$$

$$K_1 = K_{\text{NI}} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{1,\text{H}_2\text{O}}^0 + m_1[D]}{RT}\right)$$

$$K_2 = K_{\text{IU}} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{2,\text{H}_2\text{O}}^0 + m_2[D]}{RT}\right)$$

$y(D)$: Meßgröße, gemessene Fluoreszenz; y_N , y_U : Signal des gefalteten (N) und entfalteten (U) Proteins, wobei y^0 jeweils auf 0 M Denaturierungsmittel extrapolierte Werte angibt; m_N , m_U : Steigungen der Grundlinien des nativen und des denaturierten Proteins; $\Delta G_{1,\text{H}_2\text{O}}$, $\Delta G_{2,\text{H}_2\text{O}}$: freie Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels; $[D]$: Konzentration des Denaturierungsmittels; z : optische Ähnlichkeit des Intermediats mit dem entfalteten Zustand; T : Temperatur in K; R : allgemeine Gaskonstante

Gleichung 2.22 ermöglicht die Bestimmung der freien Enthalpie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels und des Kooperativitätsparameters m für die beiden Übergänge.

2.16 Experimente zur Kinetik der Proteinfaltung

2.16.1 Kinetik nach manueller Mischung

Ent- und Rückfaltungskinetik wurden nach manueller Mischung durch den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzänderung an einem Hitachi F-4010 bzw. einem Jasco FP-6500–Spektrorfluorimeter verfolgt. Die Proteinkonzentration betrug für die G3P-Varianten 0,5 μM in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0, für die β -Lactamase-Varianten 0,2 μM in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0. Zum Start der Reaktion wurde ein Volumenanteil einer zehnfach konzentrierten Proteinlösung mit neun Volumenteilen des geeigneten Puffers verdünnt. Für Entfaltungsreaktionen wurde natives Protein in verschiedenen GdmCl-Konzentrationen denaturiert, für Rückfaltungsreaktionen wurde entfaltetes Protein aus GdmCl-Puffer auf verschiedene GdmCl-Endkonzentrationen verdünnt. Die Messungen bei 25 °C erfolgten in einem Volumen von 1 700 μl bzw. 1 000 μl in 1 cm^2 -Fluoreszenzrührküvetten bei einer Bandbreite des Anregungslichts von 3 nm bzw. 5 nm und einer Bandbreite des Emissionslichts von 10 nm und bei einer Dämpfung von 0,5 s.

Für die G3P-Varianten wurden Anregungs- und Emissionswellenlänge variiert, um die Faltungskinetik der N1- und der N2-Domäne selektiv beobachten zu können. Einerseits wurde die Faltung durch Messung der Tryptophanfluoreszenz (Anregungswellenlänge: 280 bzw. 295 nm, Emissionswellenlänge: 360 nm) verfolgt, andererseits durch Messung der Tyrosinfluoreszenz (Anregung: 280 nm, Emission: 310 nm).

Um die Entfaltung der N2-Domäne im ungedockten G3P verfolgen zu können, wurden Doppelmischexperimente durchgeführt. Dabei wurde in 5 M GdmCl entfaltetes G3P 5 min in 0,5 M GdmCl rückgefaltet und dann in 1-4 M GdmCl erneut entfaltet.

Die Faltungskinetik der β -Lactamase-Varianten erfolgte durch Messung der Tryptophanfluoreszenz (Anregung: 280 nm, Emission: 340 nm).

2.16.2 Kinetik nach schneller Mischung

Schnelle Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken wurden durch schnelle Mischexperimente an einem Applied Photophysics DX.17MV Sequential *stopped-flow*-Spektrorfluorimeter durchgeführt. Dabei wurde die Reaktion durch Verdünnen einer 11fach konzentrierten Proteinlösung mit zehn Volumenteilen eines geeigneten Puffers gestartet. Für Entfaltungsreaktionen wurde natives Protein in verschiedenen GdmCl-Konzentrationen denaturiert, für Rückfaltungsreaktionen wurde entfaltetes Protein aus GdmCl-Puffer auf verschiedene GdmCl-Endkonzentrationen verdünnt. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 μM in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 für G3P-Varianten und 0,5 μM Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 für β -Lactamase-Varianten. Die Kinetiken wurden bei 25 °C anhand von Fluoreszenzänderungen gemessen.

Durch schnelle Mischung wurden die schnellen Ent- und Rückfaltungskinetiken des G3P N1N2-Fragments gemessen. Für die G3P-Varianten wurde die Fluoreszenzänderung oberhalb von 350 nm (*cut-off*-Filter: 8-Hydroxychinolin in Methanol, pH 5,3) nach Anregung bei 280 nm beobachtet. Die Bandbreite des Anregungslichts betrug 10 nm, die Schichtdicke der Beobachtungszelle 2 mm und die Spannung am Photomultiplier 780 V. Alle Kinetiken wurden mindestens fünfmal gemessen, gemittelt und gemäß Gleichung 2.23 bzw. 2.24 ausgewertet.

Die Entfaltung und Rückfaltung der isolierten N1-Domänen der stabilisierten disulfidfreien G3P-Varianten wurde in Einfachmischexperimenten durch Beobachtung der Tryptophanfluoreszenz oberhalb von 350 nm (*cut-off*-Filter: 8-Hydroxychinolin in Methanol, pH 5,3) nach Anregung bei 280 nm (Bandbreite: 10 nm) gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 μM in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,0.

Die schnellen Entfaltungskinetiken der N1-Domäne in Gegenwart der entfalteten N2-Domäne wurden durch *stopped-flow*-Doppelmischexperimente gemessen. Dazu wurden 27,5 μM entfaltetes Protein in 6 M GdmCl im ersten Schritt 11fach mit Puffer verdünnt, um die Rückfaltung bei 0,55 M GdmCl zu starten. Nach einer Sekunde Rückfaltung (nur N1 gefaltet) wurde dann in einem zweiten Schritt mit GdmCl-Lösungen variierender Konzentration sechsfach verdünnt, um N1 erneut zu entfalten. Es wurden die Fluoreszenzänderungen oberhalb von 350 nm nach Anregung bei 295 nm gemessen.

Doppelmischexperimente wurden ferner verwendet, um die Ent- und Rückfaltung von N2 in Gegenwart der bereits gefalteten N1-Domäne im ungedockten Zustand zu beobachten. Für die Beobachtung der Rückfaltungsreaktion wurde das entfaltete Protein (66 μM in 5,5 M GdmCl) in einem ersten Schritt 11fach mit Puffer verdünnt, um die Rückfaltung der N1-Domäne in 0,5 M GdmCl zu starten. Nach 0,5 s wurde in einem zweiten Schritt sechsfach mit GdmCl-Lösungen variierender Konzentration verdünnt, so dass die Rückfaltung von N2 in Bereich von 0,2 - 1,2 M GdmCl beobachtet werden konnte (Proteinkonzentration 1 μM). Um die Entfaltung von N2 im ungedockten Zustand zu beobachten, wurde das entfaltete Protein (66 μM in 5,5 M GdmCl) 5 min durch 11fache Verdünnung mit Puffer rückgefaltet und dann in einem zweiten Schritt durch sechsfache Verdünnung in GdmCl-Lösungen variierender Konzentrationen zwischen 1,5 M und 3,0 M GdmCl erneut entfaltet. Die Faltungsreaktionen der N2-Domäne wurden anhand der Fluoreszenz des Trp181 oberhalb von 320 nm (Aceton-Filter) nach Anregung bei 280 nm (10nm Bandbreite) gemessen.

Für die β -Lactamase-Varianten wurden Rückfaltungsreaktionen mittels schneller Mischung gemessen, um eine erste schnelle Faltungsreaktion zu einem Faltungsintermediat mit nichtnativer Struktur (Vanhove, 1998) beobachten zu können. Dazu wurde die Rückfaltung von 0,2 μM Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C anhand der Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen.

2.16.3 Auswertung der Kinetik-Messungen

Für die stabilisierten disulfidfreien G3P-Varianten und die stabilisierte β -Lactamase-Variante wurde die Kinetik der Proteinfaltung untersucht. Für beide Proteine ergaben sich komplexe Zeitverläufe für Ent- und Rückfaltung. Für die Auswertung wurden einfach- oder mehrfachexponentielle Kurvenverläufe angenommen (Gleichung 2.23 (Fluoreszenzabnahme) und 2.24 (Fluoreszenzzunahme)).

$$y(t) = \text{off} + \sum A_i \cdot (1 - e^{-k_i \cdot t}) \quad \text{Gl. 2.23}$$

$$y(t) = \text{off} + \sum A_i \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad \text{Gl. 2.24}$$

$y(t)$: Fluoreszenzsignal zur Zeit t ; off : Offset, Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$; A_i : Amplitude der Signaländerung; k_i : Rate der Signaländerung

Der Angleich an die experimentellen Daten erfolgte mit dem Programm Grafit 3.0 (Erithacus, Staines, UK). Die apparente Geschwindigkeitskonstante λ beinhaltet die Beiträge der Ent- und Rückfaltungsreaktion. Für das Zweizustandsmodell ergibt sich Gleichung 2.25 für die Abhängigkeit λ von [D] (Kiefhaber (1995)).

$$\lambda = k_{\text{NU}}^0 \cdot e^{m_{\text{NU}}[\text{D}]} + k_{\text{UN}}^0 \cdot e^{m_{\text{UN}}[\text{D}]} \quad \text{Gl. 2.25}$$

λ : apparente Geschwindigkeitskonstante; k_{NU}^0 , k_{UN}^0 : extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten in Abwesenheit des Denaturierungsmittels; m_{NU} , m_{UN} : kinetische Kooperativitätsparameter

Die Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante der Domänen N1 und N2 von der GdmCl-Konzentration wurde nach einem Zweizustandsmodell gemäß Gleichung 2.25 analysiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Eine stabile disulfidfreie Variante des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd

3.1.1 Selektionsstrategie

Das Gen-3-Protein (G3P) des filamentösen Phagen fd besteht, wie bereits erwähnt, aus den beiden N-terminalen Domänen N1 und N2 und der C-terminalen Domäne CT. Während N1 und N2 für die Infektion verantwortlich sind, dient CT vor allem der Verankerung des G3P in der Phagenhülle bzw. der Wirtszellmembran. Das G3P enthält drei Disulfidbrücken in den beiden N-terminalen Domänen, eine in N2 (Cys188-Cys201) und zwei in N1 (Cys7-Cys36 und Cys46-Cys53). Zusätzlich ist in der CT-Domäne eine vierte Disulfidbrücke vorhanden (C354-C371), die im Folgenden zunächst nicht berücksichtigt wird. Im *Prosided*-Selektionssystem wird ein zu stabilisierendes Gastprotein zwischen CT und N2 ins Phagen genom eingebaut, und die resultierende Phagenbibliothek wird einer Proteolyse unterworfen (1.5.2.3). Gastproteine, die selbst Cysteine enthalten, können bei der Phagenassemblierung inkorrekte Disulfidbrücken mit den Cysteinen des G3P bilden, wodurch der Phage seine Infektiosität verliert. Bislang war der Ersatz der Cysteine im Gastprotein die einzige Möglichkeit, die Infektiosität dieser Phagen zu gewährleisten. Ein infektiöser Phage mit einem stabilen disulfidfreien G3P wäre deshalb vorteilhaft, um Gastproteine in ihrem natürlichen Sequenzkontext selektieren zu können und die Einschränkungen bezüglich der Cysteinanzahl im Protein zu umgehen. Ziel war deshalb der Ersatz der Disulfidbrücken des G3P N1N2-Fragments durch *in vitro*-Evolution mittels der *Prosided*-Selektionsmethode.

Aus Untersuchungen des reduzierten G3P war bekannt, daß das N1N2-Fragment bei gleichzeitiger Entfernung aller Disulfidbrücken entfaltet vorliegt (Reiner, 2004). Deshalb wurde eine schrittweise Selektionsstrategie verfolgt. Dabei war der Ausgangspunkt eine bereits stabilisierte Variante des G3P, die aus einer Zufallsmutagenese des G3P (mit intakten Disulfidbrücken) erhalten worden war (Martin und Schmid, 2003b). Diese Variante enthält vier stabilisierende Mutationen: T13I in der N1-Domäne, Q129H im globulären Teil der N2-Domäne und T101I und D209Y in der Gelenk-Subdomäne von N2. Die Struktur des N1N2-Fragments mit den Positionen der Disulfidbrücken und der stabilisierenden Mutationen ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Drei der vier Mutationen sind in der N2-Domäne lokalisiert, welche als labilere Domäne die Gesamtstabilität bestimmt. Die Entfaltung des gereinigten N1N2-Fragments ist ein biphasischer Prozeß, in dem in einer ersten Reaktion die Dissoziation der Domänen gekoppelt mit der Entfaltung der Domäne N2 erfolgt. Die stabilere N1-Domäne entfaltet separat in einer zweiten Reaktion. Die Vierfachmutante des G3P (G3P*) konnte im Vergleich zum Wildtyp-Protein um 13,3 °C (T_m (N2, WT) = 48,5 °C, T_m (N2, G3P*) = 61,8 °C) stabilisiert werden,

die Proteaseresistenz der entsprechenden Phagen wurde um etwa 20 °C (von etwa 40 °C auf etwa 60 °C) erhöht (Martin und Schmid, 2003b).

In einer ersten Selektion wurden die Positionen der Disulfidbrücke Cys188-Cys201 in der N2-Domäne randomisiert und einer *Proside*-Selektion unterworfen, anschließend wurde die Disulfidbrücke Cys46-Cys53 in der N1-Domäne randomisiert. Die Kombination der besten Ersatzaminoaciden an diesen vier Positionen lieferte ein G3P* mit nur noch einer Disulfidbrücke. Durch Zufallsmutagenese gefolgt von einer weiteren *Proside*-Selektion wurde diese G3P*-Variante weiter stabilisiert. Die letzte Disulfidbrücke Cys7-Cys36 in N1 konnte nur durch ortsgerichtete Mutagenese ersetzt werden, und dieses Konstrukt wurde dann durch eine weitere Zufallsmutagenese und *Proside*-Selektion stabilisiert.

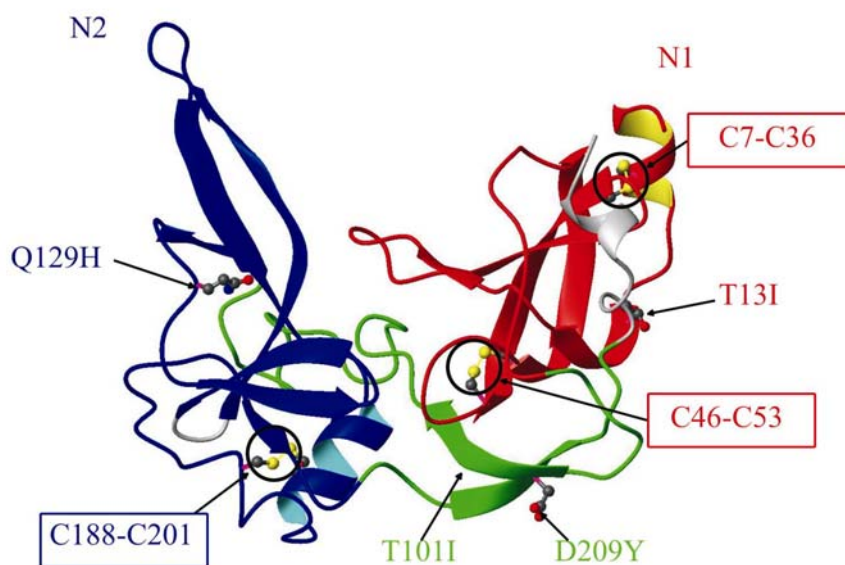


Abbildung 3.1: Tertiärstruktur des G3P N1N2-Fragments mit den drei Disulfidbrücken und den vier stabilisierenden Mutationen (Kristallstrukturdaten von Holliger *et al.*, 1999, *pdb-File 2 G3P*). Domäne N1 ist in rot dargestellt, Domäne N2 in blau und die Gelenk-Subdomäne von N2 in grün. Die Seitenketten der vier stabilisierenden Mutationen und der Cysteine sind im Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

3.1.2 Ersatz der Disulfidbrücke in N2

Für den Ersatz der Disulfidbrücke Cys188-Cys201 in N2 wurden diese Positionen randomisiert und einer thermischen *Proside*-Selektion unterworfen. Phagenbibliotheken für *Proside* werden erstellt, indem eine Genbibliothek des G3P-Fragments mit den randomisierten Positionen erstellt, diese an eine einzelsträngige Phagen-DNA angelagert und dann zum vollständigen (-)-Strang ergänzt wird. Als Matrizen-DNA kann im Falle des Disulfidbrückenersatzes keine Phagen-DNA des stabilisierten Wildtyp-G3Ps verwendet werden, da Phagen mit disulfidverbrücktem G3P deutlich stabiler als alle Phagen aus der Bibliothek wären und diese schnell aus der Bibliothek verdrängen würden. Um optimale Substitutionen für die Disulfidbrücke 188 und 201 zu finden, wurde eine Genbibliothek mit den randomisierten Positionen an eine Phagen-DNA angelagert, die an Position 188 Alanin und an Position 201 Leucin codiert. Ein Alanin-Leucin-Paar nimmt einen ähnlichen Raum ein

wie eine Disulfidbrücke und eignet sich daher gut als Ausgangspunkt für die Selektion. Die Genbibliotheken wurden mit Primermischungen erstellt, die an den entsprechenden Positionen zwar degeneriert waren, jedoch keine Cysteine zuließen. Trotzdem konnten Cystein-Codons nicht vollständig aus den Startbibliotheken ausgeschlossen werden. Die hier unerwünschte Selektion der sehr stabilen G3P*-Varianten mit Cystein-Codons an beiden Positionen, die in der Startbibliothek aufgrund von Primerverunreinigungen nur in minimalen Mengen vorhanden sind, bestätigte aufs Neue die enorme Leistungsfähigkeit des *Proside*-Selektionssystems.

Um die G3P*-Varianten mit Cys188-Cys201 zu unterdrücken, wurde nach jeder Selektionsrunde die doppelsträngige Phagen-DNA isoliert, die G3P*-Bibliothek amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym *Alw*NI inkubiert, das selektiv im Cys188-Codon schneidet. Im Verlauf der Selektion konnten damit Klone mit Disulfidbrücke C188-C201 zwar zurückgedrängt, aber nicht vollständig aus der Bibliothek entfernt werden. Einzelklone mit C188-C201-Disulfidbrücke wurden nach der Selektion ebenfalls durch Restriktion mit *Alw*NI identifiziert.

Tabelle 3.1: Stabilisierte Varianten aus der G3P*-Bibliothek mit randomisierter Disulfidbrücke C188-C201.

Bibliothek C188-C201	Selektionsrunde	selektierte Aminosäure (Codon) an Position		Häufigkeit	spontane Mutationen
		188	201		
1	4 (50 °C)	Gly (GGG)	Val (GTG)	1/4	
	4 (50 °C)	Val (GTG)	Ala (GCA)	1/4	T56I
1	5 (50 °C)	Gly (GGG)	Cys (TGT)	1/6	L198I
	5 (50 °C)	Gly (GGT)	Cys (TGT)	1/6	
	5 (50 °C)	Gly (GGA)	Val (GTG)	1/6	
	5 (50 °C)	Val (GTG)	Ala (GCA)	1/6	L198V
	5 (50 °C)	Gly (GGG)	Val (GTC)	1/6	
1	7 (52,5 °C)	Gly (GGG)	Val (GTC)	1/4	S207L
1	8 (52,5 °C)	Val (GTG)	Ala (GCG)	1/4	
2	4 (47,5 °C)	Val (GTA)	Ala (GCG)	1/3	
	4 (47,5 °C)	Val (GTG)	Ala (GCA)	1/3	
	4 (47,5 °C)	Val (GTG)	Ala (GCC)	1/3	

Angegeben sind die selektierten Aminosäuren und ihre Codons. Die Häufigkeit gibt den Anteil sequenzierter Klone mit den entsprechenden Mutationen an der Gesamtzahl sequenzierter Klone aus dieser Selektionsrunde an. Unterschiede zwischen der Gesamtzahl sequenzierter Klone und der Summe der hier aufgeführten Varianten beruhen auf dem Auftreten von Varianten mit Cys-Codons an beiden Positionen. Bei einigen selektierten Varianten traten zusätzlich spontane Mutationen an anderen Positionen auf, die in der letzten Spalte aufgeführt sind.

Die Selektion stabilisierter G3P*-Varianten erfolgte durch schrittweise Erhöhung des Selektionsdrucks von 45 °C auf 52,5 °C in Gegenwart von 2,5 µM Chymotrypsin.

Aus zwei Bibliotheken konnten nach Selektion bei 50 °C und 52,5 °C drei verschiedene Varianten selektiert werden, wobei für alle selektierten Reste verschiedene Codons gefunden wurden, ein Zeichen für die Diversität der Bibliotheken und eine Selektion auf der Ebene der Aminosäuren. Die selektierten Varianten und ihre Codons sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

An Position 188 wurde Glycin mehrfach selektiert, zum einen in Kombination mit Valin, zum anderen in Kombination mit Cystein. Da Glycin zu einer Erhöhung der Flexibilität und damit zu einem Entropieverlust bei der Proteinfaltung führt, sollte eine entsprechende Mutation für eine erhöhte thermische Stabilität des Proteins ungünstig sein. Der Grund für die Selektion von Glycin könnten in diesem Fall ungünstige Rückgratwinkel im Wildtyp-Protein sein. Am häufigsten wurde die Kombination Val188 / Ala201 selektiert (6 x mit vier verschiedenen Kombinationen der Codons für Val und Ala). Zusätzlich zu den randomisierten Positionen sind in einigen Klonen an den Positionen 56, 198 und 207 spontane Mutationen aufgetreten. Die Phagen mit den entsprechenden G3P*-Varianten zeigten im Vergleich zum C188A / C201L-Ausgangsphegen eine deutlich erhöhte Proteaseresistenz, wobei der Phage mit den Val188 / Ala201-Substitutionen und der zusätzlichen spontanen Mutation T56I in N1 am stabilsten gegenüber Proteolyse mit Chymotrypsin war (Proteaseresistenz um etwa 13 °C erhöht). Die Proteaseresistenz der Phagen ist in Abbildung 3.2 a dargestellt.

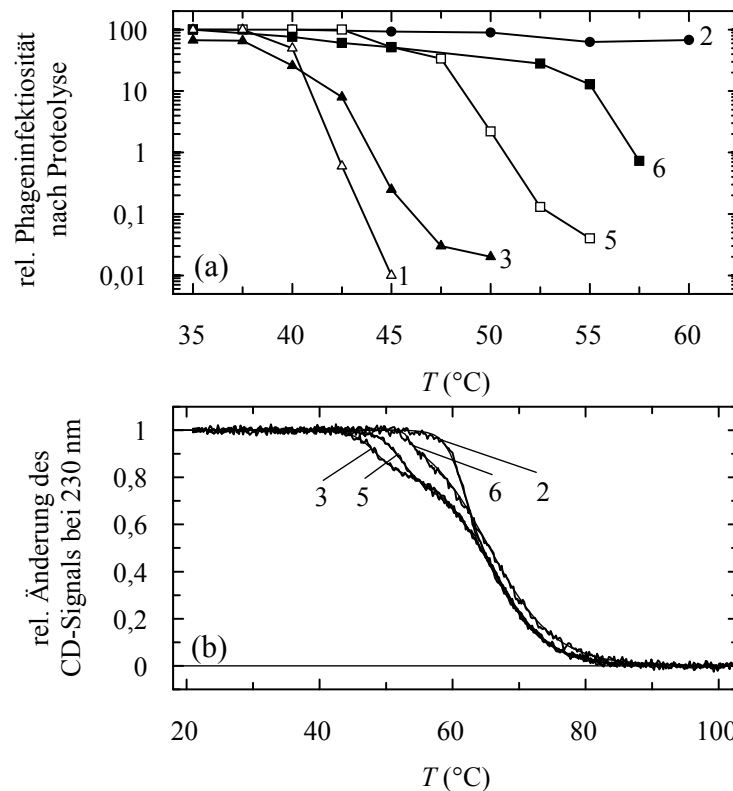


Abbildung 3.2: (a) Infektiositäten der selektierten Phagen mit Mutationen an den Positionen 188 und 201 in Abhängigkeit von der Temperatur (Proteaseresistenz der Phagen): C188A/C201L (3, \blacktriangle), C188G/C201V (5, \square), and C188V/C201A/T56I (6, \blacksquare) G3P*, G3P (Wildtyp) (1, \triangle) und G3P* (2, \bullet). Die 15minütige Proteolyse wurde mit etwa 10^9 Phagen in 100 mM Kalium-Phosphat, 100 μ M CaCl_2 (pH 8,0) mit 2,5 μ M Chymotrypsin durchgeführt. Die Infektiosität nach der Inkubation eines Kontrollansatzes bei der gleichen Temperatur wurde gleich 100 % gesetzt. (b) Thermische Stabilität der selektierten G3P*-Varianten mit Mutationen an den Positionen 188 und 201: G3P* (2), C188A/C201L G3P* (3), C188G/C201V G3P* (5) und C188V/C201A/T56I G3P* (6). Die Übergänge wurden mittels CD bei 230 nm verfolgt. Die relative Signaländerung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Abbildung 3.2 b zeigt die thermische Stabilität der gereinigten G3P*-Proteine mit Mutationen an den Positionen 188 und 201. Die Stabilitätsdaten für alle G3P-Varianten sind in Tabelle 3.2 aufgelistet, wobei die Varianten mit zwei Disulfidbrücken in N1 als 2SS-G3P*, solche mit der Disulfidbrücke C7-C36 in N1 als 1SS-G3P* und disulfidfreie Varianten als 0SS-G3P* bezeichnet werden. Die Entfaltungsenthalpien der G3P*-Varianten aus Tabelle 3.2 sind im Anhang in Tabelle 9.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Stabilitätsdaten für Wildtyp-G3P und alle selektierten G3P*-Varianten.

Nr.	G3P-Variante	N1-N2 Fragment		isolierte N1
		T_m (N2) (°C)	T_m (N1) (°C)	T_m (°C)
1	Wildtyp	48,5	60,0	62,4
2	G3P*	61,8	66,1	67,5
3	2SS-G3P* C188A/C201L	48,1	65,8	67,5
4	2SS-G3P* C188G	47,1	66,5	67,5
5	2SS-G3P* C188G/C201V	51,8	66,3	67,5
6	2SS-G3P* C188V/C201A/T56I	53,3	66,5	
7	2SS-G3P* C46A/C53L		52,6	46,6
8	2SS-G3P* C46G/C53I		53,1	47,2
9	2SS-G3P* C46G/C53V		53,7	
10	2SS-G3P* C46A/C53V		55,7	49,1
11	2SS-G3P* C46I/C53V		59,1	55,2
12	1SS-G3P*	45,5	51,4	55,2
14	1SS-G3P* V2	60,6	66,4	
16	1SS-G3P* V4		62,3	
17	1SS-G3P* V5		62,4	
18	1SS-G3P* V6		63,1	
19	0SS-G3P* R29W/N39K	53,2	63,0	62,6
20	0SS-G3P* R29W/N39K/G55A/I60V/F199L	58,1	70,4	67,9
21	0SS-G3P* R29W/N39K/N15G/G55A/F199L	60,1	75,2	77,5
23	0SS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/ T56I/I60V/N138G/L198P/F199L/S207L	67,0	78,7	79,0

Angegeben sind die Schmelztemperaturen (T_m) für alle G3P*-Varianten. Die T_m -Werte für die N1- bzw. N2-Domäne sind die Mittelpunkte des ersten (N2) bzw. zweiten (N1) Übergangs im biphasischen Entfaltungsübergang des N1N2-Fragments nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell. Die T_m -Werte der isolierten N1-Domänen sind die Mittelpunkte der einphasigen Entfaltung von N1 nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell. Für die 2SS-G3P*-Varianten mit substituierter Disulfidbrücke 46-53 und für einige 1SS-G3P*-Varianten sind die Übergänge nicht zu trennen. In diesem Fall sind apparente T_m -Werte angegeben, die die Hälfte der Signaländerung angeben. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die N2-Domäne eine konstante Wärmekapazitätsänderung von $\Delta C_p = 10\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ und für die N1-Domäne ein konstantes ΔC_p von $1\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ angenommen. Varianten V2-V6 sind in Tabelle 3.5 näher erläutert. Die Nummerierung der Varianten dient der Identifizierung der Varianten in den folgenden Abbildungen.

Wie bereits erwähnt, ist im Wildtyp-Protein N2 die labilere Domäne. In den Varianten mit substituierter Disulfidbrücke C188-C201 ist die N2-Domäne durch den Verlust der Disulfidbrücke stark destabilisiert. Dies wird bei Betrachtung der Variante C188A / C201L (Sequenz des Ausgangsphagen) deutlich, N2 ist von 61,8 °C auf 48,1 °C destabilisiert.

Domänen dissoziation und Entfaltung der N2-Domäne laufen auch bei diesen Varianten in einer gekoppelten ersten Reaktion ab. Alle selektierten Varianten zeigen im Vergleich zur Ala / Leu-Variante eine erhöhte Thermostabilität, und die Reihenfolge der Varianten stimmt mit der Reihenfolge der Proteaseresistenz der zugehörigen Phagen überein. Die separat-entfaltende, stabilere N1-Domäne wird durch die Mutationen in N2 nicht in ihrer Stabilität beeinflusst, so daß die spontane Mutation T56I für die Betrachtung der Disulfidbrücke in N2 nicht von Bedeutung ist. Die Kombination Val188 / Ala201 ist der beste selektierte Ersatz für die Disulfidbrücke in N2. Die Variante hat einen Übergangsmittelpunkt von $T_m = 53,3\text{ °C}$, welcher einer Stabilisierung von $5,2\text{ °C}$ im Vergleich zur Ala / Leu-Variante entspricht.

3.1.3 Ersatz der Disulfidbrücken in N1

Für den Ersatz der Disulfidbrücke C46-C53 in der N1-Domäne wurde, wie im Falle der Disulfidbrücke C188-C201, eine Phagenbibliothek auf der Grundlage einer Ala / Leu-Matrizen-DNA erstellt. Auch in dieser Bibliothek mußten Varianten mit Cysteinen an den Positionen 46 und 53 durch Restriktion, in diesem Fall mit *BtsI*, eliminiert werden. Um die Erkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym zu generieren, mußte dazu eine stille Mutation für Thr51 eingeführt werden (ACT → ACG). In zwei unabhängigen Bibliotheken wurde in der folgenden *Proside*-Selektion die Temperatur von 40 °C bis auf 50 °C bzw. 70 °C erhöht. In der ersten Selektion wurden drei verschiedene Varianten gefunden. Die Variante Ala / Val trat mit drei verschiedenen Codon-Kombinationen auf und war die am häufigsten selektierte Variante. Auch in dieser Bibliothek wurden Varianten mit einer Glycin-Mutation identifiziert, in Kombination mit Ile oder Val. In der zweiten Bibliothek wurde die Variante Ile46 / Val53 nur einmal gefunden. Auffällig ist, daß bei allen G3P*-Varianten mit Mutationen an den Positionen 46 und 53 an Position 53 eine C^β-verzweigte Aminosäure vorhanden ist. Die selektierten Varianten sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

Tabelle 3.3: Stabilisierte Varianten aus der G3P*-Bibliothek mit randomisierter Disulfidbrücke C46-C53.

Bibliothek C46-C53	Selektions- runde	selektierte Aminosäure (Codon) an Position				Häufigkeit
		46		53		
1	4 (47,5 °C)	Gly	(GGG)	Ile	(ATA)	1/1
1	5 (50 °C)	Ala	(GCG)	Val	(GTG)	9/14
	5 (50 °C)	Ala	(GCG)	Val	(GTA)	1/14
	5 (50 °C)	Ala	(GCG)	Val	(GTT)	2/14
	5 (50 °C)	Gly	(GGG)	Val	(GTT)	1/14
	5 (50 °C)	Gly	(GGG)	Val	(GTA)	1/14
2	6 (70 °C)	Ile	(ATA)	Val	(GTA)	1/4

Angegeben sind die selektierten Aminosäuren und ihre Codons. Die Häufigkeit gibt den Anteil sequenzierter Klone mit den entsprechenden Mutationen an der Gesamtzahl sequenzierter Klone aus dieser Selektionsrunde an. Unterschiede zwischen der Gesamtzahl sequenzierter Klone und der Summe der hier aufgeführten Varianten beruhen auf dem Auftreten von Varianten mit Cys-Codons an beiden Positionen.

Alle Phagen mit G3P*-Varianten mit substituierter Disulfidbrücke C46-C53 sind infektiös und damit funktional. Abbildung 3.3 a zeigt die Infektiositäten in Abhängigkeit von der Temperatur. Im Vergleich zur Ala / Leu-Variante (Ausgangsphege) ist eine erhöhte Proteaseresistenz der Phagen mit selektierten G3P*-Varianten erkennbar. Am stabilsten gegenüber Proteolyse sind Phagen mit Ile46 / Val53-G3P* (Variante 11).

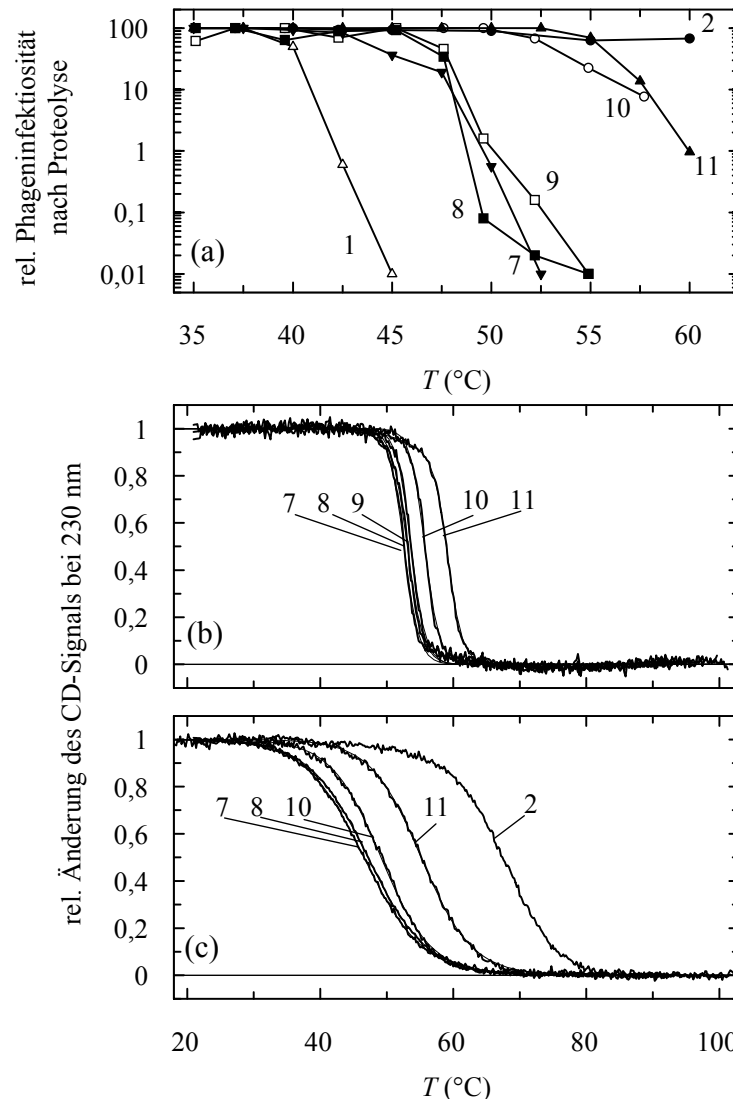


Abbildung 3.3: (a) Infektiositäten der selektierten Phagen mit Mutationen an den Positionen 46 und 53 in Abhängigkeit von der Temperatur (Proteaseresistenz der Phagen): C46A/C53L (7, ▼), C46G/C53I (8, ■), C46G/C53V (9, □), C46A/C53V (10, ○) und C46I/C53V (11, ▲) G3P*, G3P (Wildtyp) (1, △) und G3P* (2, ●). Die 15minütige Proteolyse wurde mit etwa 10^9 Phagen in 100 mM Kalium-Phosphat, 100 μ M CaCl_2 (pH 8,0) mit 2,5 μ M Chymotrypsin durchgeführt. Die Infektiosität nach der Inkubation eines Kontrollansatzes bei der gleichen Temperatur wurde gleich 100 % gesetzt. (b) Thermische Stabilität der selektierten G3P-Varianten mit Mutationen an den Positionen 46 und 53: C46A/C53L (7), C46G/C53I (8), C46G/C53V (9), C46A/C53V (10) und C46I/C53V G3P* (11). (c) Thermische Übergänge der isolierten N1-Domänen der selektierten G3P*-Varianten mit Mutationen an den Positionen 46 und 53: G3P* (2), C46A/C53L (7), C46G/C53I (8), C46A/C53V (10) und C46I/C53V G3P* (11) sind dargestellt. Die relative Änderung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell (b, c) ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Die thermischen Entfaltungsübergänge der gereinigten Proteine (Abbildung 3.3 b) sind hochkooperativ und nicht zweiphasig wie der Übergang des Wildtyp-Proteins. Die Deletion der Disulfidbrücke C46-C53 hat eine starke Destabilisierung der N1-Domäne zur Folge. In allen Varianten ohne C46-C53 ist die Domänen dissoziation nicht nur mit der Entfaltung von N2, sondern auch mit der Entfaltung der N1-Domäne gekoppelt. Die Entfaltung ist daher ein hochkooperativer Prozeß. Da die kooperative Einheit in diesem Fall aus beiden Domänen und der Domänengrenzfläche besteht, sind die Entfaltungsübergänge stark temperaturabhängig, denn die Enthalpie reflektiert alle Wechselwirkungen im Protein. Ebenso wie bei den Proteasestabilitäten der zugehörigen Phagen zeigt die thermische Entfaltung der gereinigten N1N2-Fragmente die größte Stabilisierung für den Ersatz Ile46 / Val53 ($T_m = 59,1\text{ °C}$). Relativ zur Ala / Leu-Variante beträgt die Stabilisierung $6,5\text{ °C}$.

Im N1N2-Fragment ist die Entfaltung der N1-Domäne nicht unabhängig von der Entfaltung von N2 und der Domänen dissoziation zu betrachten (thermodynamische Kopplung der Entfaltungsreaktionen). Deshalb wurden die selektierten Mutationen auch in der isolierten N1-Domäne betrachtet. Die thermischen Übergänge sind in Abbildung 3.3 c dargestellt. Auch in diesem Fall zeigt sich die starke Stabilisierung durch den Ersatz I46 / V53. Betrachtet man die Differenz der Schmelzpunkte von I46 / V53 und A46 / L53, so zeigt sich in Abwesenheit der N2-Domäne ein größerer Effekt als im N1N2-Fragment ($\Delta T_m = 8,6\text{ °C}$ im Vergleich zu $6,5\text{ °C}$ im N1N2-Fragment). Dies deutet auf eine Stabilisierung der N1-Domäne durch die Assoziation mit N2 im N1N2-Fragment hin. Der Beginn des Übergangs ist im N1N2-Fragment um etwa 10 °C zu höherer Temperatur verschoben.

Eine Selektion zum Ersatz der zweiten Disulfidbrücke in N1, C7-C36, war nicht möglich. Zur Selektion wurde ein Ausgangs-Phage mit einem Ala / Leu-Ersatz an den Positionen 7 und 36 erstellt. Da der Phage ohne Disulfidbrücke C7-C36 jedoch nicht infektiös war, konnte keine *Prosede*-Selektion durchgeführt werden.

3.1.4 *GdmCl-induzierte Entfaltung*

Zusätzlich zur thermischen Entfaltung wurde die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung der Varianten untersucht. Die GdmCl-induzierte Entfaltung kann mittels zweier Sonden betrachtet werden. In der N1-Domäne sind drei Tyrosinreste und drei Tryptophanreste vorhanden, deshalb kann die Änderung der Tryptophanfluoreszenz als Sonde für die N1-Domäne verwendet werden. Bei der Entfaltung geht vermutlich eine Fluoreszenzlöschung der Tryptophanreste in N1 durch die räumlich nahen Histidinreste 221-226 (des für die Reinigung verwendeten His-Tags) verloren, so daß ein Anstieg der Fluoreszenz bei 360 nm zu erwarten ist. Da in der N2-Domäne ebenfalls ein Tryptophan (W181) enthalten ist, wird diese Sonde häufig durch einen Beitrag dieses Tryptophans verändert. Die N2-Domäne enthält elf Tyrosinreste und nur ein Tryptophan, so daß die Änderung der Tyrosinfluoreszenz als Sonde für diese Domäne verwendet werden kann. Im Referenz-Protein G3P* löscht His129 die Fluoreszenz benachbarter Tyr-Reste. Bei der Entfaltung geht dieser Effekt verloren, und es kommt zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Dies gilt auch für die hier betrachteten Varianten

mit Mutationen an den Positionen 188 und 201. Die GdmCl-induzierten Entfaltungsübergänge der Varianten mit substituierter Disulfidbrücke in N2 sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

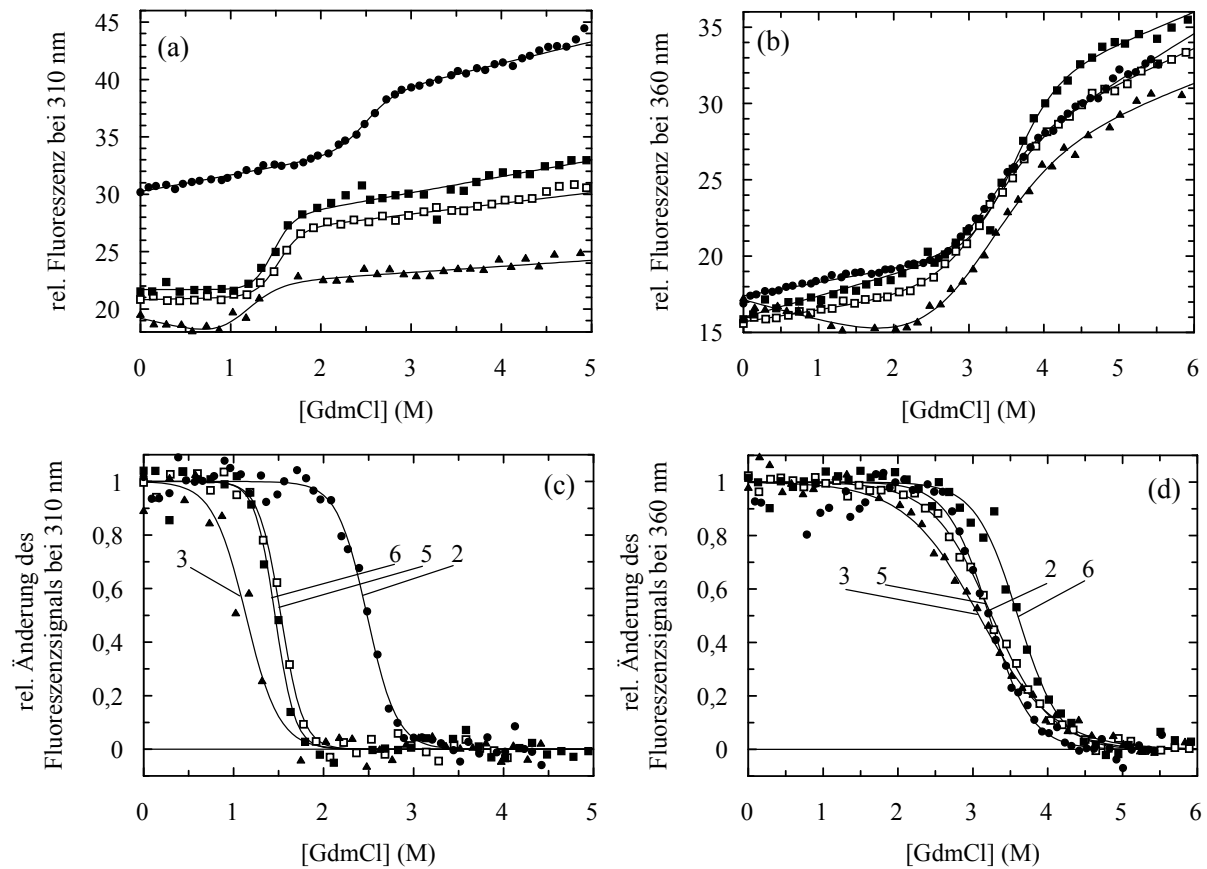


Abbildung 3.4: GdmCl-induzierte Entfaltung der Varianten mit substituierter Disulfidbrücke C188-C201 in N2, G3P* (2, ●), C188A/C201L (3, ▲), C188G/C201V (5, □) und C188V/C201A/T56I (6, ■). (a) Entfaltungsübergänge der N2-Domänen beobachtet bei 310 nm (Anregungswellenlänge 280 nm), (b) Entfaltungsübergänge der N1-Domänen beobachtet bei 360 nm (Anregungswellenlänge 295 nm), (c) normierte Entfaltungsübergänge der N2-Domänen, (d) normierte Entfaltungsübergänge der N1-Domänen. Die Übergänge wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm, bei 25 °C und Bandbreiten von 5 nm (Anregung) und 10 nm (Emission) gemessen. Die Numerierung der Varianten entspricht Tabelle 3.2.

Im Vergleich zur stabilisierten, disulfidhaltigen Variante G3P* fällt die starke Destabilisierung durch die Substitution der Disulfidbrücke in der N2-Domäne auf. Die Entfaltung der N2-Domänen zeigt für die Stabilität die gleiche Abfolge der Varianten wie bei der thermischen Entfaltung, d. h. der Valin / Alanin-Ersatz ist am stabilsten.

Auch für den Ersatz der Disulfidbrücke C46-C53 in der N1-Domäne wurde die GdmCl-induzierte Entfaltung der Varianten untersucht (Abbildung 3.5). Interessanterweise ist die Fluoreszenz der Varianten ohne die C46-C53-Disulfidbrücke stark erhöht und nimmt im Verlauf der Entfaltung ab, nicht zu wie beim Wildtyp-Protein. Vermutlich löscht C46-C53 die Fluoreszenz des benachbarten Tyr102 im gefalteten, aber nicht im entfalteten Wildtyp-Protein.

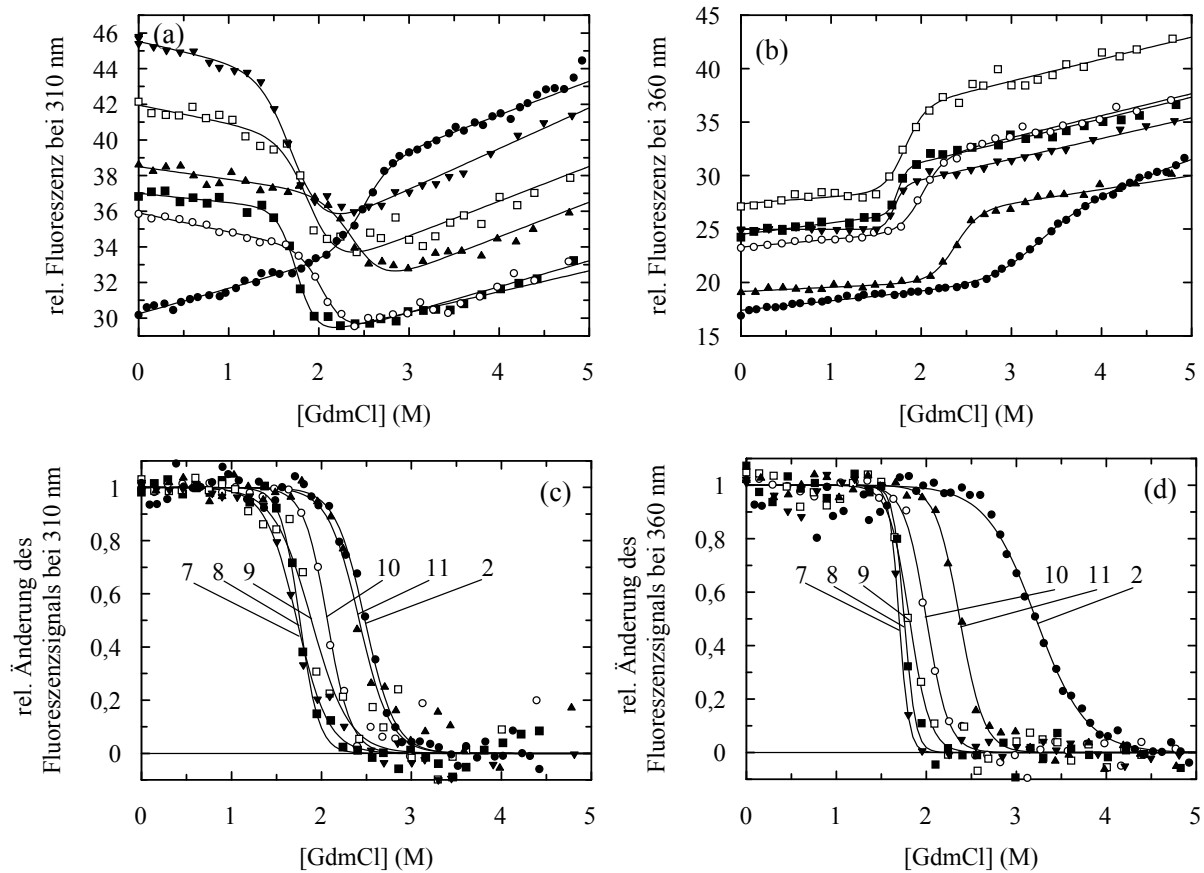


Abbildung 3.5: GdmCl-induzierte Entfaltung der Varianten mit substituierter Disulfidbrücke C46-C53 in N1, G3P* (2, ●), C46A/C53L (7, ▼), C46G/C53I (8, ■), C46G/C53V (9, □), C46A/C53V (10, ○), C46I/C53V (11, ▲). (a) Entfaltungsübergänge der N2-Domänen beobachtet bei 310 nm (Anregungswellenlänge 280 nm), (b) Entfaltungsübergänge der N1-Domänen beobachtet bei 360 nm (Anregungswellenlänge 295 nm), (c) normierte Entfaltungsübergänge der N2-Domänen, (d) normierte Entfaltungsübergänge der N1-Domänen. Die Übergänge wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm, 25 °C und Bandbreiten von 5 nm (Anregung) und 10 nm (Emission) gemessen.

Die Ergebnisse aus der GdmCl-induzierten Entfaltung bestätigen die Ergebnisse der thermischen Entfaltung. Die Übergangsmittelpunkte der Entfaltungsübergänge bei den Wellenlängen 310 nm (Sonde für die N2-Domäne) und 360 nm (Sonde für die N1-Domäne) sind praktisch identisch. Dies bestätigt, daß die Domänen dissoziation tatsächlich mit der Entfaltung beider Domänen gekoppelt ist. Die Reihenfolge der Varianten entspricht den thermischen Stabilitäten und ist im Einklang damit, daß Ile / Val der beste Disulfidbrückenersatz an diesen Positionen ist.

In Tabelle 3.4 sind die Stabilitätsdaten für die GdmCl-induzierte Entfaltung der 2SS-Varianten aufgeführt. Die geringe Änderung des Fluoreszenzsignals der Sonden für N1 und N2 sowie der Einfluß von Trp181 (N2) auf die Trp-Fluoreszenz-Sonde für N1 führen zu einer geschätzten Genauigkeit von etwa ± 10 %.

Tabelle 3.4: Stabilitätsdaten für Wildtyp-G3P, sowie die 2SS-G3P*-Varianten und 1SS-G3P*.

Nr.	G3P-Variante	Entfaltung von N2 (310 nm)			Entfaltung von N1 (360 nm)		
		m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)
1	Wildtyp	18,8	26,6	1,4	8,6	22,6	2,6
2	G3P*	14,9	37,2	2,5	8,9	28,6	3,2
3	C188A/C201L	13,4	15,3	1,1	5,0	15,4	3,1
4	C188G	12,4	10,3	0,8	5,9	18,6	3,1
5	C188G/C201V	20,2	30,8	1,5	6,2	20,3	3,3
6	C188V/C201A/T56I	22,5	32,9	1,5	8,8	31,7	3,6
7	C46A/C53L	14,2	24,6	1,7	45,6	77,4	1,7
8	C46G/C53I	23,3	41,0	1,8	39,9	70,1	1,8
9	C46G/C53V	15,5	29,7	1,9	21,9	39,6	1,8
10	C46A/C53V	19,1	39,4	2,1	20,3	40,6	2,0
11	C46I/C53V	14,3	34,7	2,4	18,6	44,2	2,4
12	1SS-G3P*			2,1			1,5

Angegeben sind die Übergangsmittelpunkte ($[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M), sowie der Kooperativitätsparameter m ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$) und $\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol) in Abwesenheit des Denaturierungsmittels für die N2- und die N1-Domäne. Da die Fluoreszenzänderung bei den betrachteten Wellenlängen sehr klein ist, wird die Genauigkeit auf $\pm 10\%$ geschätzt. Die Entfaltung der N2-Domäne wurde nach Anregung bei 280 nm anhand der Fluoreszenzänderung bei 310 nm verfolgt. Die Entfaltung der N1-Domäne wurde nach Anregung bei 295 nm anhand der Fluoreszenzänderung bei 360 nm verfolgt. Die Analyse der Daten erfolgte für beide Domänen auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. Für die Varianten mit substituierter Disulfidbrücke Cys46-Cys53 in N1 ist nur die Angabe apparater thermodynamischer Parameter möglich, da die Annahme des Zweizustandsmodells für die beiden separaten Domänen nicht mehr zutrifft, die kooperative Einheit umfaßt in diesem Fall beide Domänen. Für 1SS-G3P* ist lediglich die GdmCl-Konzentration angegeben, bei der die Hälfte der Fluoreszenzänderung erreicht ist, da in diesem Fall der Mechanismus der Entfaltung nicht dem Zweizustandsmodell folgt.

Für die Varianten mit substituierter Disulfidbrücke Cys188-Cys201 entsprechen die m -Werte und damit die Kooperativitäten von N1 und N2 im Rahmen der Genauigkeit den Ergebnissen für das disulfidverbrückte Protein. Für die Varianten mit substituierter Disulfidbrücke Cys46-Cys53 in N1 sind die Kooperativitäten für die Übergänge bei beiden betrachteten Wellenlängen größer. Bei einer gekoppelten Entfaltung der Domänen müßte auch die Kooperativität der Übergänge der Summe der Kooperativitäten von N1 und N2 entsprechen. Dies trifft nur für einige Varianten in etwa zu. Eine genauere Aussage ist hier nicht möglich, da wegen der geringen Fluoreszenzänderung der m -Wert nicht verlässlich bestimmt werden konnte.

3.1.5 Fazit aus dem evolutiven Ersatz der Disulfidbrücken im G3P

Alle drei Disulfidbrücken im G3P nehmen energetisch günstige Konformationen ein. Dies gilt für die Diederwinkel der Seitenketten (χ_1 und χ_2) von fünf der sechs Cysteinreste und für alle drei Disulfidbrücken-Torsionswinkel (Bhattacharyya *et al.*, 2004).

Für die Disulfidbrücke C188-C201 ist V188 / A201 der stabilste Ersatz. Diese Disulfidbrücke ist im Wildtyp-Protein von zwei Phe-Resten umgeben (Phe134 und Phe135), eine aromatische Umgebung, welche die Disulfidbrücke zusätzlich stabilisiert. Diese hydrophobe Umgebung

der aromatischen Ringe ist auch für den Val-Ala-Ersatz günstig. Ein Ala / Val-Paar konnte auch in Arbeiten mit dem pankreatischen Trypsin-Inhibitor (BPTI) als stabilster Ersatz für die Disulfidbrücke C30-C51 identifiziert werden. In dieser Arbeit von Liu *et al.* wurde der Disulfidbrückenersatz durch ortsgerichtete Mutagenese untersucht (Liu *et al.*, 1997). Die Randomisierung der Disulfidbrücke im V_L-Fragment eines *single-chain*-Antikörperfragments führte ebenfalls zur Selektion der Kombination Ala-Val (Proba *et al.*, 1998).

Für die Disulfidbrücke C46-C53 in der N1-Domäne des G3P wurde Ile / Val als bester Ersatz identifiziert. Bei der Randomisierung dieser Disulfidbrücke trat ebenfalls die Kombination Ala / Val auf, war jedoch nicht die stabilste Kombination. Dies verdeutlicht, daß der günstigste Ersatz einer Disulfidbrücke von der detaillierten Raumstruktur in ihrer Umgebung abhängig ist. Die Disulfidbrücke C46-C53 ist ebenso wie C188-C201 im Innern des Proteins vergraben, und deshalb sind hydrophobe Reste hier günstig. Die Rückgratdiederwinkel sind für C^β-verzweigte Aminosäuren günstig ($\Phi = -123^\circ$, $\Psi = 161^\circ$). Betrachtet man die C^α-C^β-Vektoren der C46-C53-Disulfidbrücke, so sind diese parallel. Im Gegensatz dazu sind die C^α-C^β-Vektoren der Disulfidbrücke C188-C201 einander zugewandt. Dies erklärt die Selektion des größeren Ile / Val-Paares an den Positionen 46 und 53 im Vergleich zum kleineren Ersatz Val / Ala an den Positionen 188 und 201. Die bereits erwähnte Selektion von Glycin-Resten kann im Fall des Ersatzes von Cys188 durch ungünstige Rückgratwinkel des Cys im Wildtyp-Protein erklärt werden. Auch bei der Randomisierung der Disulfidbrücke C46-C53 wurde Glycin als Cystein-Ersatz an Position 46 selektiert. Hier sind allerdings keine ungünstigen Rückgratwinkel verantwortlich zu machen. Da Gly aufgrund der fehlenden Seitenkette sehr flexibel ist, begünstigt diese Aminosäure den entfalteten Zustand entropisch und sollte daher destabilisierend wirken. Trotzdem konnte ein entsprechender Ersatz eines Cysteins in einer Disulfidbrücke durch ein Glycin auch in einem *Screening*-Verfahren zum Ersatz der Disulfidbrücke C14-C38 in BPTI identifiziert werden (Hagihara *et al.*, 2002). In diesem Fall wurden verschiedene Kombinationen mit Glycin gefunden, wobei die stabilste Variante die Kombination G14 / V38 enthielt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Disulfidbrücken durch alternative Aminosäurekombinationen ersetzt werden können. Die nichtkovalenten Wechselwirkungen entsprechender Aminosäuren können allerdings nur einen geringen Teil des Stabilitätsverlusts der Disulfidbrücke kompensieren.

Besonders deutlich wird der stabilisierende Beitrag bei Betrachtung der isolierten N1-Domänen. Die Substitution der Disulfidbrücke durch Ala / Leu (Ausgangspunkt für die Selektion) destabilisiert das G3P* (bei 55 °C) um 14 kJ/mol. Der stabilisierende Beitrag des Ile / Val-Ersatzes stabilisiert im Vergleich zu A46 / L53 um 5,5 kJ/mol und ist damit immer noch 8,5 kJ/mol instabiler als die entsprechende disulfidverbrückte N1-Domäne von G3P*.

3.1.6 Selektion stabilisierender second-site Mutationen in 1SS-G3P

Die besten Disulfidsubstitutionen aus den *Proside*-Selektionen wurden in einer Variante kombiniert. Phagen, die diese Vierfach-Variante des G3P* mit den Mutationen I46 / V53 / V188 / A201 enthalten, sind infektiös (Abbildung 3.7 a) und bis etwa 40 °C proteasestabil. Das gereinigte N1N2-Fragment (1SS-G3P*) besitzt bei thermischer Entfaltung einen Übergangsmittelpunkt von etwa 50 °C (Abbildung 3.7 b). Bei GdmCl-induzierter Entfaltung ergeben sich für die verschiedenen Sonden zur Betrachtung von N1 und N2 unterschiedliche Stabilitäten (Abbildung 3.6). Während der Übergangsmittelpunkt im Entfaltungsübergang gemessen anhand der Fluoreszenz bei 310 nm bei 2,1 M GdmCl liegt, ist der Übergangsmittelpunkt bei Beobachtung der Entfaltung durch die Fluoreszenz bei 360 nm bereits bei 1,5 M GdmCl erreicht. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Dreizustandsverhalten im thermischen Übergang überein. Die Zuordnung der Domänen zu den mit den verschiedenen Sonden erhaltenen Übergängen ist hier jedoch schwierig. Bei 310 nm (N2-Sonde) ergibt sich in diesem Fall eine höhere Stabilität als bei 360 nm (N1-Sonde). Dies würde eine Umkehrung in der Stabilität der Domänen bedeuten.

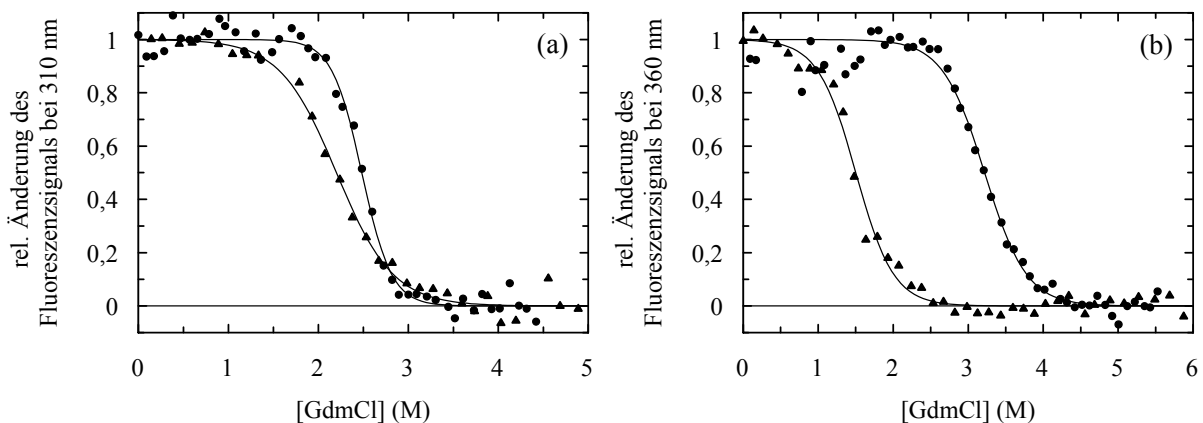


Abbildung 3.6: GdmCl-induzierte Entfaltung von 1SS-G3P* (12, ▲) im Vergleich zu G3P* (2, ●). (a) Normierte Entfaltungsübergänge der N2-Domänen beobachtet bei 310 nm (Anregungswellenlänge 280 nm), (b) normierte Entfaltungsübergänge der N1-Domänen beobachtet bei 360 nm (Anregungswellenlänge 295 nm). Die Übergänge wurden mit 0,5 µM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm, bei 25 °C und Bandbreiten von 5 nm (Anregung) und 10 nm (Emission) gemessen.

Um diese 1SS-G3P*-Variante weiter zu stabilisieren, wurde eine Zufallsmutagenese durchgeführt. Durch *error-prone*-PCR mit anschließender *Proside*-Selektion konnten in vier verschiedenen Bibliotheken neun *second-site*-Mutationen selektiert werden. Die Positionen und die gefundenen Mutationen sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Varianten V4 - V7 wurden von C. Bippes im Rahmen einer Diplomarbeit selektiert und charakterisiert (Bippes, 2004). In der N1-Domäne wurden vor allem die Mutationen R29W und N39K selektiert. In Bibliothek 3 trat an Position 53 eine Mutation zu Ala auf. In der N2-Domäne wurden vor allem die Mutationen L198P, L198V und F199L identifiziert.

Tabelle 3.5: Stabilisierte Varianten aus der Zufallsmutagenese von 1SS-G3P*.

Position	G3P*	Variante						
		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
29	Arg	Trp	Trp					Trp
39	Asn				Lys	Lys	Lys	
53	Cys				Ala	Ala	Ala	
56	Thr			Ile				Ile
65	Pro				His	His		
138	Asn					Gly	Gly	
198	Leu	Pro		Pro	Val	Val	Val	
199	Phe		Leu		Leu	Leu	Leu	
207	Ser		Leu					

Vier unabhängige Bibliotheken wurden mittels fehlerbehafteter PCR erstellt und einer *Proside*-Selektion unterworfen. Variante 1 (3x selektiert) und Variante 2 (2x selektiert) stammen aus Bibliothek 1, Variante 3 wurde 7x in Bibliothek 2 gefunden, Variante 4 (1x selektiert), 5 (2x selektiert) und 6 (1x selektiert) wurden in Bibliothek 3 selektiert und Variante 7 konnte 4x in Bibliothek 4 identifiziert werden.

Alle selektierten 1SS-G3P*-Varianten sind stark stabilisiert. Dies wird zum einen deutlich, wenn man die Proteaseresistenz der zugehörigen Phagen betrachtet, da alle Varianten bis 55 °C bzw. 57 °C proteaseresistent sind. Zum anderen bestätigt auch die thermische Entfaltung der gereinigten N1N2-Fragmente die erhöhte Thermostabilität der Varianten. Die selektierten 1SS-G3P*-Varianten zeigen einen zweiphasigen Verlauf der thermischen Entfaltung, wobei die Trennung der Domänen quantitativ nicht möglich ist, da sich die Stabilität der Domänen nur minimal unterscheidet. Eine verlässliche Analyse eines Dreizustandsübergangs kann nur dann erfolgen, wenn die beiden Übergänge der Domänen deutlich voneinander getrennt erscheinen (Tsalkova und Privalov, 1985; Brandts *et al.*, 1989). Für einige 1SS-Varianten sind deshalb nur apparente T_m -Werte angegeben, welche die Hälfte der Signaländerung angeben (Variante 16 - 18, Tabelle 3.2). Die Variante 1SS-G3P* R29W / F199L / S207L ist am stabilsten, und die beiden Entfaltungsreaktionen sind am deutlichsten getrennt. Die Infektiositäten der Phagen bei verschiedenen Temperaturen und die thermischen Übergänge sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

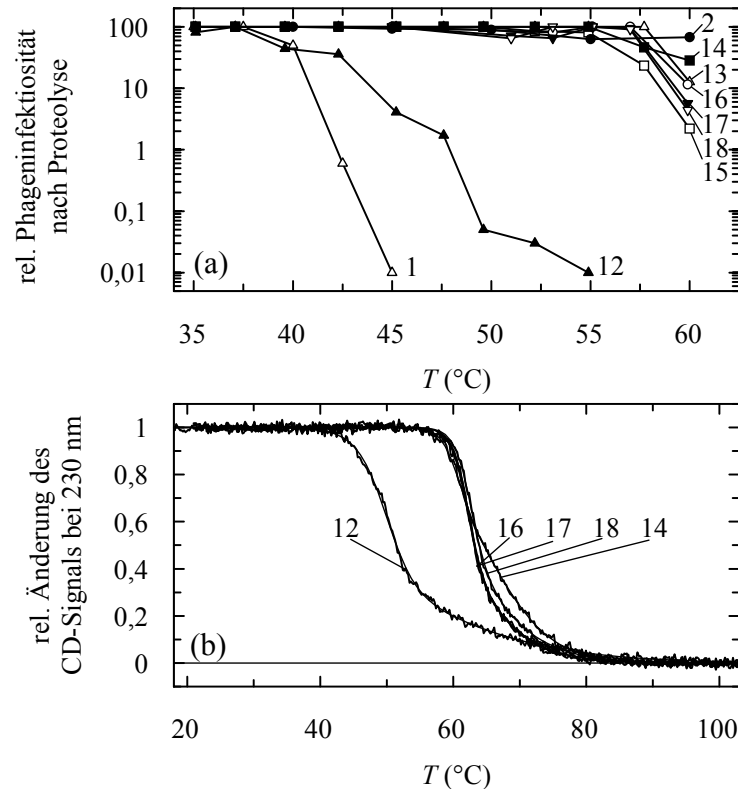


Abbildung 3.7: (a) Infektiositäten der selektierten Phagen aus der Zufallsmutagenese von 1SS-G3P* in Abhängigkeit von der Temperatur (Proteaseresistenz der Phagen): 1SS-G3P* V1(13, Δ), V2 (14, \blacksquare), V3 (15, \square), V4 (16, \circ), V5 (17, \blacktriangledown), V6 (18, ∇), G3P (Wildtyp) (1, \triangle) und G3P* (2, \bullet). Die 15minütige Proteolyse wurde mit etwa 10^9 Phagen in 100 mM Kalium-Phosphat, 100 μ M CaCl_2 (pH 8,0) mit 2,5 μ M Chymotrypsin durchgeführt. Die Infektiosität nach der Inkubation eines Kontrollansatzes bei der gleichen Temperatur wurde gleich 100 % gesetzt. (b) Thermische Stabilität der selektierten 1SS-G3P*-Varianten: 1SS-G3P* (12), V2 (14), V4 (16), V5 (17), V6 (18). Die Mutationen der Varianten V2-V6 sind in Tabelle 3.5 erklärt. Die relative Änderung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

3.1.7 Nah-UV- und Fern-UV-CD-Spektren der G3P*-Varianten mit substituierten Disulfidbrücken

Um die Beiträge einzelner Aminosäuren zur Stabilität des disulfidfreien G3P* bestimmen zu können, wurde zunächst anhand von CD-Spektren überprüft, ob die N1N2-Fragmente bzw. die isolierten N1-Domänen strukturiert sind. Beispielhaft wurden Fern-UV-Spektren von 1SS-G3P* (nur noch die Disulfidbrücke Cys7-Cys36 in N1 intakt) und 0SS-G3P* N1 R29W / N39K (disulfidfreie N1-Domäne) und Nah-UV-Spektren der Varianten 2SS-G3P* C46I / C53V und 2SS-G3P* C188V / C201A / T56I bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

Während Spektren im Fern-UV-Bereich Auskunft über die Sekundärstruktur des Proteins geben, wird das Signal im Nah-UV-CD vor allem durch die Beiträge von aromatischen Aminosäuren bestimmt. Die Spektren der verschiedenen G3P*-Varianten sind in Abbildung 3.9 a (Fern-UV-CD) bzw. Abbildung 3.9 b (Nah-UV-CD) dargestellt. Sowohl das N1N2-Fragment der Variante 1SS-G3P* als auch die N1-Domäne 0SS-G3P* R29W / N39K sind bei

20 °C bzw. 25 °C strukturiert. Die thermische Entfaltung kann anhand der Änderung des CD-Signals bei 230 nm verfolgt werden.

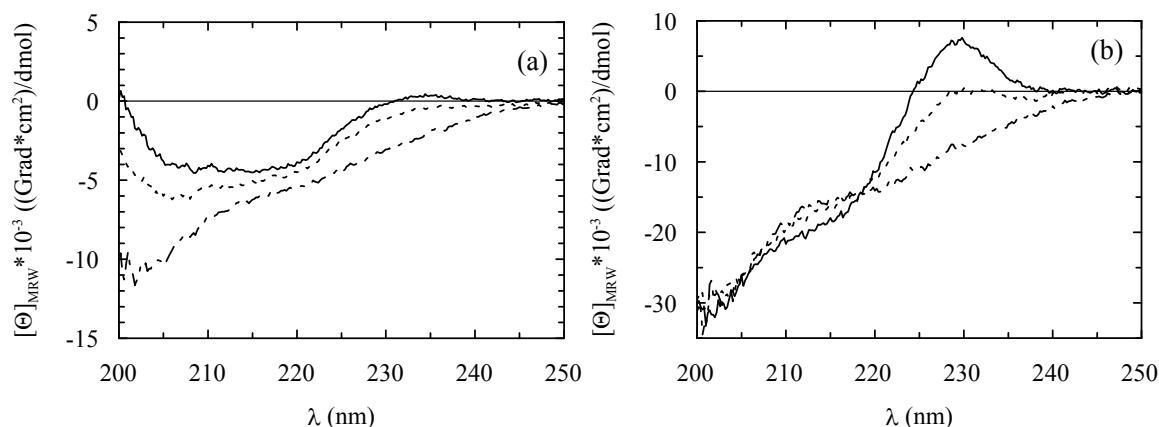


Abbildung 3.8: (a) Fern-UV-CD-Spektren der Variante 1SS-G3P* bei 20 °C (—), 45 °C (····) und 80 °C (---). (b) Fern-UV-CD-Spektren von 0SS-G3P* N1 R29W/N39K bei 25 °C (—), 60 °C (····) und 85 °C (---). Die Spektren wurden mit 4 μ M Protein in 10 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 2 mm, einer Bandbreite von 1 nm und mit einer Geschwindigkeit von 20 nm/min (Dämpfung 1 s) gemessen.

Die Nah-UV-CD-Spektren der 2SS-G3P*-Varianten zeigen ebenfalls, daß die entsprechenden N1N2-Fragmente strukturiert vorliegen.

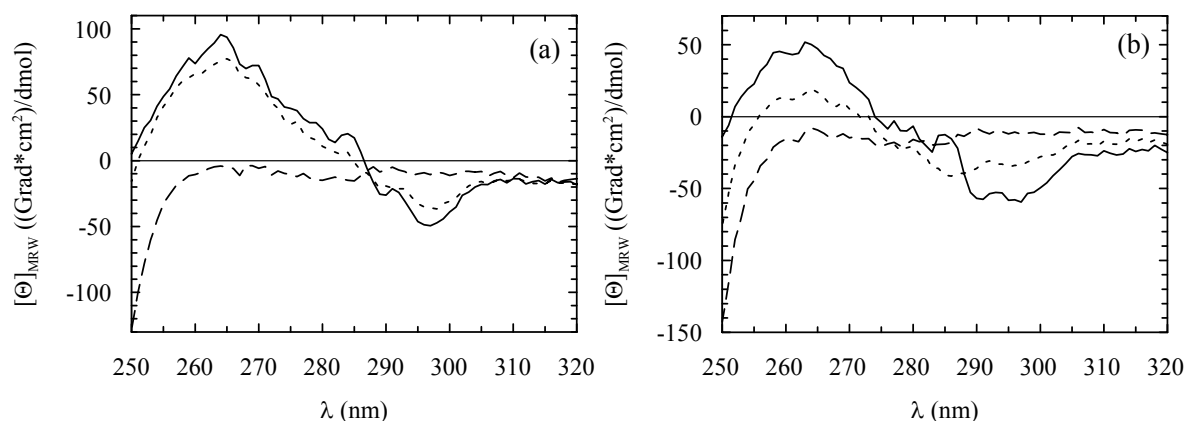


Abbildung 3.9: (a) Nah-UV-CD-Spektren von 2SS-G3P* C46I/C53V bei 20 °C (—), 55 °C (····) und 80 °C (---). (b) Nah-UV-CD-Spektren von 2SS-G3P* C188V/C201A/T56I bei 30 °C (—), 65 °C (····) und 90 °C (---). Die Spektren wurden mit 20 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm, einer Bandbreite von 1 nm und einer Geschwindigkeit von 10 nm/min (Dämpfung 4 s) gemessen.

3.1.8 Generierung eines stabilen disulfidfreien G3P

Für die Disulfidbrücke C7-C36 konnte, wie bereits erläutert, kein Ersatz durch *Proside*-Selektion gefunden werden. Deshalb wurde diese Disulfidbrücke durch ortsgerichtete Mutagenese substituiert. An Position 7 wurde ein Serin, an Position 36 ein Isoleucin als Ersatz für das Cystein gewählt. An Position 7 wurde ein Serin anstelle eines aliphatischen Restes gewählt, da Cys7 im Wildtyp-Protein mit drei Carbonyl-Sauerstoff-Atomen interagiert. Diese Mutationen wurden mit den anderen Disulfidbrücken-Ersätzen kombiniert, um so eine in N1 und N2 disulfidfreie G3P*-Variante erhalten (0SS-G3P*). Da Phagen mit dieser G3P*-Variante sehr instabil (0SS-G3P*: $T_m = 36,7$ °C) und wenig infektiös sind,

wurden zusätzliche stabilisierende Mutationen aus der 1SS-G3P*-Zufallsmutagenese eingeführt. 0SS-G3P* mit den zusätzlichen Mutationen R29W und N39K wurde einer Zufallsmutagenese durch fehlerbehaftete PCR gefolgt von einer *Proside*-Selektion unterworfen. Tabelle 3.6 zeigt die Ergebnisse der Selektion aus zwei unabhängigen Bibliotheken.

Tabelle 3.6: Stabilisierte Varianten aus der 0SS-G3P*-Zufallsmutagenese.

Position	G3P*	0SS-G3P*	Variante		
			21	20	22
15	Asn		Gly		
29	Arg	Trp	Trp	Trp	Trp
39	Asn	Lys	Lys	Lys	Lys
55	Gly		Ala	Ala	Ala
60	Ile			Val	Val
199	Phe		Leu	Leu	

Zwei unabhängige Bibliotheken wurden erstellt und einer *Proside*-Selektion unterworfen. Variante 21 (3x selektiert) stammt aus Bibliothek 1, Varianten 20 (1x selektiert) und 22 (2x selektiert) wurden in Bibliothek 2 identifiziert. In dieser Bibliothek traten zusätzlich fünf stille Mutationen auf. Die Bezeichnung der Varianten entspricht der Nomenklatur aus Tabelle 3.1.

In der ersten Bibliothek konnte nach zehn Selektionsrunden eine einzige Variante identifiziert werden, die zusätzlich die Mutationen N15G / G55A und F199L enthielt. In der zweiten Bibliothek wurden zwei neue Varianten identifiziert, die zusätzlich zu 0SS-G3P* R29W / N39K die Mutation G55A in Kombination mit I60V bzw. mit den beiden Mutationen I60V / F199L auftrat. Zusätzlich gefundene stille Mutationen weisen auf eine hohe Mutationsrate durch die fehlerbehaftete PCR hin.

Alle Phagen mit selektierten 0SS-G3P*-Varianten sind infektiös und proteaseresistent bis 52 °C (bei Proteolyse mit 2,5 µM Chymotrypsin). Im Vergleich zum disulfidverbrückten Wildtyp-G3P wird damit eine Erhöhung der Proteaseresistenz um 12 °C erreicht (Abbildung 3.10 a). Varianten 20 und 21 (Tabelle 3.6) wurden überexprimiert, gereinigt und charakterisiert. Abbildung 3.10 b zeigt die thermischen Entfaltungsübergänge dieser Varianten im Vergleich zum disulfidverbrückten Wildtyp-Protein. Beide stabilisierten Varianten zeigen einen zweiphasigen Verlauf der thermischen Entfaltung. Der erste Übergang entspricht dabei (wie im Wildtyp-Protein) der Domänendissoziation gekoppelt mit der Entfaltung der N2-Domäne. Diese erste Reaktion limitiert die Stabilität des Proteins. Die Entfaltung der N1-Domäne erfolgt in einer zweiten Reaktion. Variante 21 (0SS-G3P* R29W / N39K / N15G / G55A / F199L) ist die beste selektierte disulfidfreie G3P*-Variante. Beide Domänen sind in dieser Variante stark stabilisiert ($T_m(N2) = 60,1$ °C, $T_m(N1) = 75,2$ °C, siehe Tabelle 3.2). Besonders der Vergleich zum disulfidverbrückten Wildtyp-Protein zeigt die enorme Stabilisierung dieser disulfidfreien Variante, der Übergangsmittelpunkt der N2-Domäne wurde um 12 °C erhöht. Die N1-Domäne ist im Vergleich zum Wildtyp-Protein um etwa 15 °C stabiler. Auch in diesem Fall wurden die isolierten N1-Domänen mit den entsprechenden Mutationen exprimiert, um die Zuordnung der Domänen zu den Reaktionen

in der Entfaltung des N1N2-Fragments zu verifizieren und um die Stabilität der N1-Domäne unabhängig von Domänenwechselwirkungen untersuchen zu können. Die thermischen Übergänge der isolierten N1-Domänen dieser Varianten sind in Abbildung 3.10 c dargestellt. Der Schmelzpunkt der isolierten N1-Domäne der stabilsten selektierten Variante liegt bei 77,5 °C (Tabelle 3.2). Ein Vergleich von Abbildung 3.10 c mit Abbildung 3.3 c deutet auf eine Verringerung der Kooperativität bei Ersatz der Disulfidbrücke C7-C36 hin.

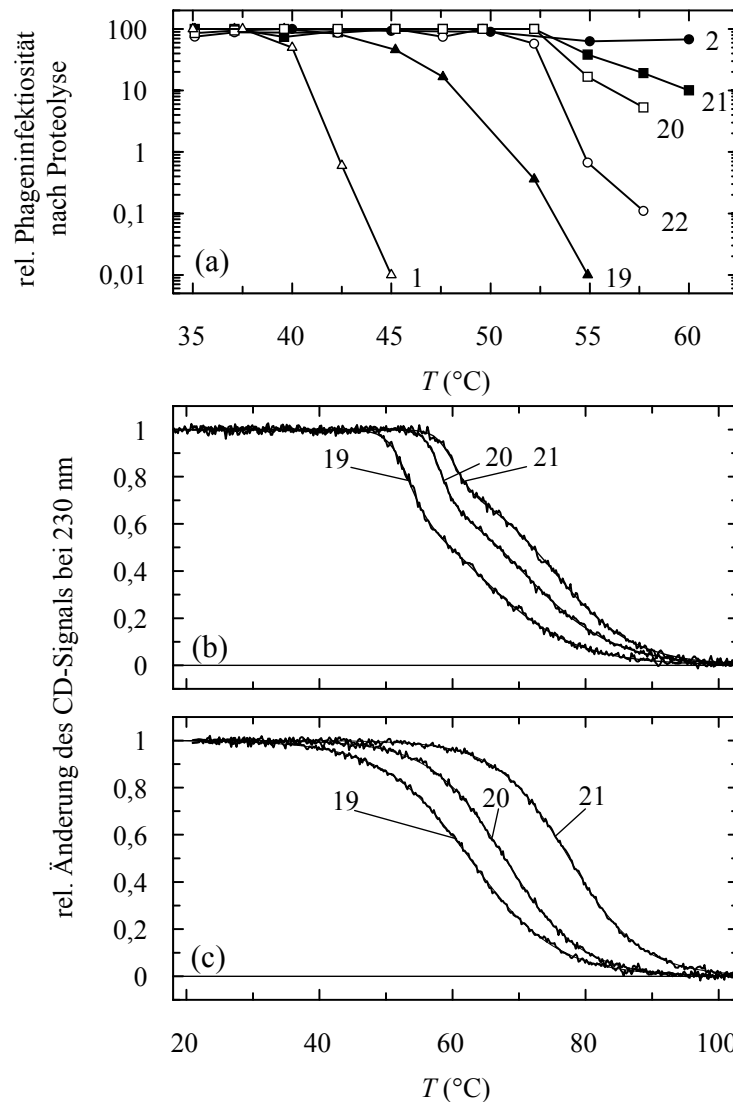


Abbildung 3.10: (a) Infektiositäten der selektierten Phagen OSS-G3P*-Varianten in Abhängigkeit von der Temperatur (Proteaseresistenz der Phagen). G3P (Wildtyp) (1, \triangle), G3P* (2, \bullet) sowie OSS-G3P* R29W/N39K (19, \blacktriangle) und die Varianten G55A/I60V/F199L (20, \square), N15G/G55A/F199L (21, \blacksquare) und G55A/I60V (22, \circ) aus der OSS-G3P* R29W/N39K-Zufallsmutagenese sind gezeigt. Die 15minütige Proteolyse wurde mit etwa 10^9 Phagen in 100 mM Kalium-Phosphat, 100 μ M CaCl_2 (pH 8,0) mit 2,5 μ M Chymotrypsin durchgeführt. Die Infektiosität nach der Inkubation eines Kontrollansatzes bei der gleichen Temperatur wurde gleich 100 % gesetzt. (b) Thermische Stabilität der selektierten OSS-G3P*-Varianten. OSS-G3P* R29W/N39K (19) und die selektierten Varianten G55A/I60V/F199L (20) und N15G/G55A/F199L (21) der OSS-G3P* R29W/N39K-Zufallsmutagenese sind dargestellt. (c) Thermische Übergänge der isolierten N1-Domänen der selektierten OSS-G3P*-Varianten. G3P* R29W/N39K (19) und die selektierten Varianten G55A/I60V/F199L (20) und N15G/G55A/F199L (21) der OSS-G3P* R29W/N39K-Zufallsmutagenese sind dargestellt. Die relative Signaländerung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

3.1.9 Kombination der stabilisierenden Mutationen im disulfidfreien G3P

In einem letzten Schritt wurden alle stabilisierenden Mutationen in einer disulfidfreien Variante mit 20 Mutationen kombiniert. Diese 0SS-G3P*-Variante (23, Tabelle 3.2) ist im Vergleich zum disulfidverbrückten Wildtyp-Protein deutlich stabilisiert. Abbildung 3.11 zeigt die thermischen Übergänge des gereinigten N1N2-Fragments im Vergleich zum Wildtyp-Protein (1) und der stabilisierten disulfidverbrückten Ausgangsvariante für die Selektion (2). Der Mittelpunkt für den ersten Übergang ist von 48,5 °C (Wildtyp-G3P, 1) auf 67,0 °C (stabilisiertes 0SS-G3P*, 23) erhöht und ist damit auch noch deutlich stabiler als das stabilisierte disulfidverbrückte Ausgangsprotein (2, $T_m(N2) = 61,2$ °C) (Martin und Schmid, 2003b). N1 ist im Vergleich zum Wildtyp-G3P um 14,6 °C stabilisiert ($T_m = 79,0$ °C (isolierte N1-Domäne)). Die thermischen Übergänge der isolierten N1-Domänen sind in Abbildung 3.11 b dargestellt.

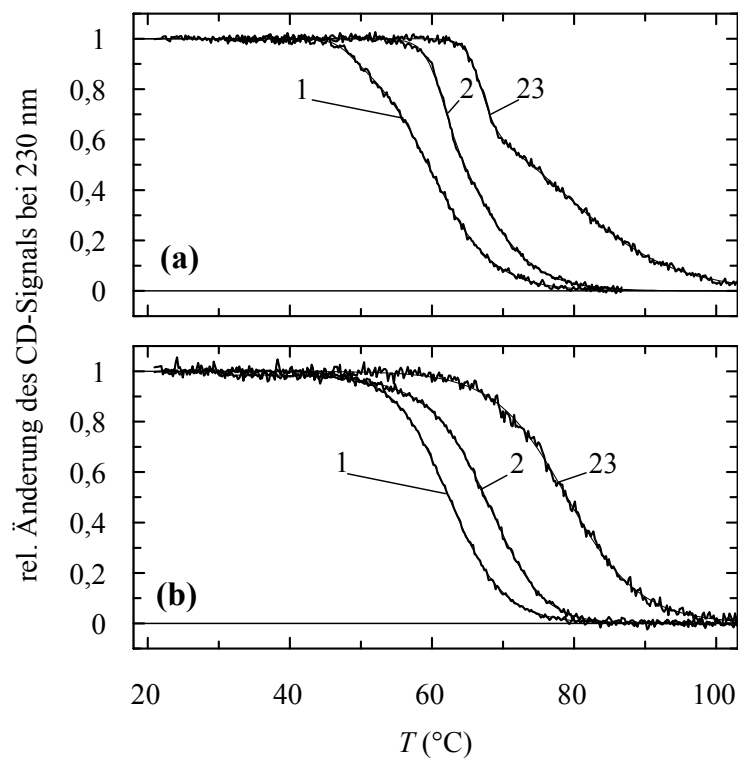


Abbildung 3.11: Thermische Stabilität der Kombinationsvariante 0SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen (23). Die Variante enthält die Mutationen N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V/N138G/L198P/F199L/S207L im disulfidfreien 0SS-G3P*. Zum Vergleich sind die thermischen Übergänge vom Wildtyp-G3P (1) und G3P* (2) gezeigt. (a) Thermische Entfaltungsübergänge der gereinigten N1N2-Fragmente. (b) Thermische Entfaltungsübergänge der isolierten N1-Domänen. Die relative Signaländerung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell (a) bzw. einem Zweizustandsmodell (b) ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden mit 4 µM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Für das disulfidfreie G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen wurden Reversibilitätstests durchgeführt. Die thermische Entfaltung erfordert in diesem Fall die Denaturierung des Proteins bei 85 °C. Das Protein wurde daher kurz bei 85 °C entfaltet, schnell abgekühlt und

erneut thermisch entfaltet. Das CD-Signal dieses Entfaltungsübergangs ist dabei nur etwa halb so groß wie bei der Entfaltung des nativen Proteins. Die Reversibilität wurde außerdem durch kalorimetrische Messungen analysiert. Bei thermischer Entfaltung mittels DSC geht dem Signal der Entfaltung der N2-Domäne immer ein sehr kleines Signal voraus. Bei erneutem Erhitzen des Proteins auf 55 °C, also bis kurz vor den Übergang der N2-Domäne, verschwindet dieses zusätzliche Signal. Es handelt sich dabei evtl. um falsch gefaltete Spezies. Zweimaliges Erhitzen auf 70 °C (N2-Domäne ist vollständig entfaltet, N1 ist noch gefaltet) gibt Aufschluß über die Reversibilität der N2-Domäne. Beim zweiten Erhitzen beträgt das Signal über 90 % im Vergleich zum Signal des ersten Übergangs, so daß man von einer hohen Reversibilität ausgehen kann. Bei zweimaligem Denaturieren bei 90 °C gehen etwa 50 % des Signals verloren. Bei diesen sehr hohen Temperaturen kommt es zur Aggregation des Proteins. Ferner tritt ein zusätzliches Signal bei etwa 50 °C auf, welches mit jedem erneuten Denaturieren des Proteins zunimmt und auf nicht korrekt gefaltete Moleküle hinweist. Die Annahme eines zunehmenden Anteils von Aggregat wird durch eine höhere Wärmekapazität des nativen Proteins bestätigt, die ihre Ursache in einer größeren zugänglichen hydrophoben Oberfläche der teilweise denaturierten Moleküle hat. Insgesamt kann man jedoch von einer hohen Reversibilität des Faltungsvorgangs ausgehen.

3.1.10 Fazit aus der Stabilisierung durch second-site-Mutationen

Durch die Zufallsmutagenesen mit 1SS-G3P* und 0SS-G3P* konnten *second-site*-Mutationen gefunden werden, die das G3P* so stark stabilisieren, daß nicht nur der enorme Stabilitätsverlust durch das Aufbrechen der drei Disulfidbrücken kompensiert werden konnte, sondern darüberhinaus das Protein so stark optimiert wurde, daß seine konformationelle Stabilität erheblich über der des ursprünglichen Wildtyp-Proteins liegt. So zeigte sich für die N1-Domäne eine Stabilisierung um 15 °C und für N2 um 7 °C (relativ zum disulfidverbrückten Wildtyp-Protein). Die in der Kombinationsvariante mutierten 20 Reste sind in der Wildtyp-Kristallstruktur in Abbildung 3.12 hervorgehoben. Alle selektierten Mutationen sind nahe der Proteinoberfläche lokalisiert und damit teilweise lösungsmittel exponiert. Im Proteininneren konnten lediglich stille Mutationen identifiziert werden. Dies weist auf eine gute Packung des Domäneninneren hin. Eine ähnliche Stabilisierung durch Mutationen an der Proteinoberfläche konnte bereits bei der *in-vitro*-Evolution des Kälteschockproteins CspB erreicht werden (Martin *et al.*, 2002; Wunderlich *et al.*, 2005a).

Die Stabilität von Zweidomänen-Proteinen wird durch die Domänenwechselwirkungen und durch die Stabilität der labileren Domäne bestimmt (Campos *et al.*, 2004; Brandts *et al.*, 1989). Dies entspricht dem ersten Übergang in der thermischen Entfaltung des N1N2-Fragments der G3P*-Varianten. Die Temperatur, bei der das Protein zu entfalten beginnt, stimmt mit dem Beginn der Proteaseempfindlichkeit der entsprechenden Phagen überein.

In der Zufallsmutagenese des 0SS-G3P* sind die meisten selektierten Mutationen in der N1-Domäne lokalisiert. Da N1 durch den Verlust von zwei Disulfidbrücken sehr stark

destabilisiert wird, ist diese Domäne im disulfidfreien Protein limitierend für die Stabilität und damit auch limitierend in der Selektion.

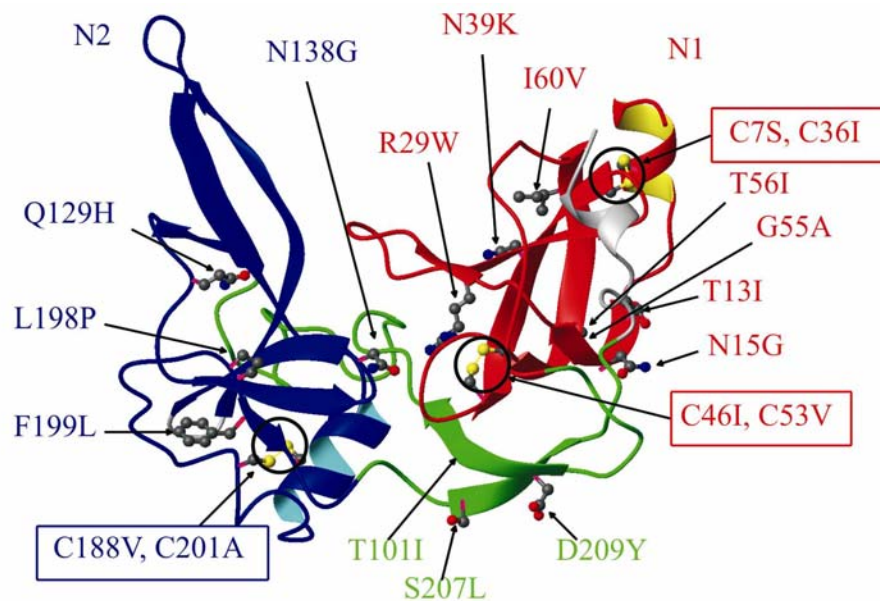


Abbildung 3.12: Tertiärstruktur des G3P* N1N2-Fragments mit allen selektierten stabilisierenden Mutationen, die in der Kombinationsvariante enthalten sind (Kristallstrukturdaten von Holliger *et al.*, 1999, *pdb-File* 2 G3P). Domäne N1 ist in rot dargestellt, Domäne N2 in blau und die Gelenk-Subdomäne von N2 in grün. Die Seitenketten der stabilisierenden Mutationen und der Cysteine sind im Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

Sowohl N1 als auch N2 wurden durch die letzte Selektion so stark stabilisiert, daß sie deutlich stabiler sind als das disulfidverbrückte Wildtyp-Protein. Dies zeigt, daß der Verlust der Disulfidbrücken durch nichtkovalente Wechselwirkungen an anderen Stellen im Protein überkompensiert werden kann. Durch Zufallsmutagenese ist nur ein kleiner Sequenzraum verfügbar, der jedoch für die Selektion stabilisierender Mutationen ausreichend war.

Die Entfaltungsenthalpie der N1-Domänen ohne Disulfidbrücken ist deutlich verringert, wohingegen deren Schmelzpunkt deutlich erhöht ist. Diese Tatsache scheint der Selektion auf erhöhte Thermostabilität zu widersprechen, jedoch wurde durch die *Proside*-Selektion lediglich auf Proteaseresistenz bei erhöhter Temperatur selektiert. Dies bedingt eine Domänendissoziation und Entfaltung bei höherer Temperatur, dem Ergebnis der Analyse der selektierten Varianten.

In der *Proside*-Selektion mit anschließender Phagenpropagation in *E. coli* kommen zwei Selektionsprinzipien zusammen. Zum einen wird im *in-vitro*-Schritt, der Proteolyse der Phagen, auf eine erhöhte Thermostabilität selektiert. Die hier verwendete Protease Chymotrypsin spaltet dabei nach aromatischen bzw. großen hydrophoben Resten, also in Bereichen, die im gefalteten Zustand unzugänglich im Proteininnern liegen. Der zweite Schritt ist die Phagenpropagation. Phagen, die Defekte bei der Reifung des Phagenpartikels bzw. in der Infektiosität aufweisen, werden in dieser *in-vivo*-Selektion eliminiert. Da die

disulfidfreien Varianten trotz ihres Nachteils in der Infektiosität selektiert wurden, muß die Selektion hauptsächlich durch die Thermostabilität der Varianten bestimmt werden.

Das immer wiederkehrende Auftreten von disulfidverbrückten G3P*-Varianten in der Selektion, die in den Bibliotheken in nur äußerst geringer Konzentration vorliegen können, verdeutlicht den enormen Beitrag von Disulfidbrücken zur Proteinstabilität.

3.1.11 Biologische Funktion der selektierten G3P-Varianten

Eine Voraussetzung für die Selektion der disulfidfreien G3P*-Varianten ist die Infektiosität der zugehörigen Phagen. Um die relative Infektiosität der selektierten Varianten mit drei, zwei oder einer Disulfidbrücke bzw. den disulfidfreien G3P*-Varianten vergleichen zu können, wurden von fünf Varianten Phagenlösungen mit gleicher Phagenkonzentration hergestellt. Die Normierung wurde anhand des Gehalts an einzelsträngiger DNA durchgeführt. Die Phagenlösungen wurden zur Infektion von Aliquots der gleichen *E. coli* TG1-Kultur verwendet. Die Ergebnisse des Infektionstests bei 37 °C zeigt Abbildung 3.13. Alle G3P*-Varianten sind infektiös, jedoch wird die Infektiosität der Phagen mit Wildtyp-G3P von 5×10^{10} cfu/ml von keiner anderen Variante erreicht. Für die G3P*-Varianten mit drei, zwei bzw. einer Disulfidbrücke liegen die Infektiositäten zwischen $9 \cdot 10^9$ - $4 \cdot 10^9$ cfu/ml. Die 0SS-G3P*-Variante ist mit $5 \cdot 10^8$ cfu/ml nochmals um eine Zehnerpotenz weniger infektiös.

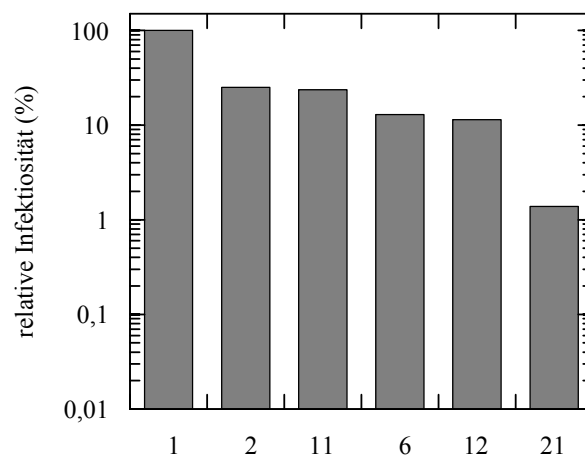


Abbildung 3.13: Relative Infektiosität der selektierten Phagen-Varianten. Phagen mit Wildtyp-G3P (1), dem disulfidverbrückten G3P* (2), mit 2SS-G3P* C46I/C53V (11), 2SS-G3P* C188V/C201A/T56I (6), 1SS-G3P* (12) und 0SS-G3P* R29W/N39K/N15G/G55A/F199L (21) sind vergleichend dargestellt. *E. coli* TG1-Zellen wurden mit Phagenlösungen der gleichen Phagenkonzentration infiziert. Die Infektion erfolgte mit einem Überschuss an *E. coli* TG1-Zellen. Die Infektiosität der Wildtyp-Phagen wurde gleich 100 % gesetzt.

Die biologische Funktion der G3P-Varianten ist abhängig von der Stabilität der beiden N-terminalen Domänen bzw. von deren Interaktionen. Das G3P interagiert während des Infektionsprozesses mit unterschiedlichen Partnern. Das G3P ist in der assoziierten Konformation zwar stabil, in dieser Form kann jedoch keine Infektion erfolgen. Stattdessen wird erst durch die Bindung an den bakteriellen F-Pilus eine Schwächung der

Domäneninteraktionen bewirkt, wodurch die TolA-Bindungsstelle der N1-Domäne zugänglich wird. TolA, der Phagenrezeptor an der Zelloberfläche, kann dann mit der N1-Domäne des Phagen wechselwirken. Da die TolA-Bindungsstelle an der Domänengrenzfläche lokalisiert ist, ist sie im assoziierten Zustand nicht zugänglich. Die Stabilität der Domänen und ihrer Interaktion spielt daher eine große Rolle für den Infektionsprozeß. Einerseits muß das N1N2-Fragment im nichtgebundenen Zustand stabil genug sein, andererseits müssen die Domäneninteraktionen im N1N2-Fragment bei der Infektion gelöst werden, d.h. die Domäneninteraktionen dürfen für die biologische Funktion nicht zu stark sein. Während der Infektion muß die N1-Domäne dann aber weiterhin gefaltet sein, um mit TolA wechselwirken zu können.

Diese Anforderungen werden bei der Entfaltung der N1N2-Fragmente deutlich. Der erste Übergang repräsentiert die Domänendissoziation und die Entfaltung von N2, N1 entfaltet dann separat. Dies ist eventuell auch eine Erklärung für die Verteilung der Disulfidbrücken im N1N2-Fragment des G3P. In der N1-Domäne sind zwei Disulfidbrücken enthalten, die einen entscheidenden Anteil an der Stabilität der Domäne haben. Der Ersatz der Disulfidbrücke C46-C53 führt zu keinem nennenswerten Verlust an Phageninfektiosität (Abbildung 3.13, Nr. 2 und 11) im Vergleich zum disulfidverbrückten G3P*. Wenn jedoch die Disulfidbrücke C7-C36 substituiert wird, resultiert dies in einem Verlust an Infektiosität (keine infektiösen Phagen im C7S / C36I G3P*). Ursache für diesen Effekt kann einerseits der große Stabilitätsverlust durch den Ersatz der Disulfidbrücke C7-C36 sein, andererseits könnten die Mutationen aber auch die Wechselwirkungen mit TolA direkt beeinflussen.

Nur in Gegenwart von *second-site*-Mutationen werden für diese Varianten infektiöse Phagen erhalten, die jedoch im Vergleich zu G3P* nur 10 % der Infektiosität besitzen (Nr. 2 und 21). Im Falle der durch *second-site*-Mutationen stabilisierten 0SS-G3P*-Variante (Abbildung 3.13) muß hier zusätzlich die Position der *second-site*-Mutationen berücksichtigt werden. Die geringere Infektiosität kann in einer verbesserten Domäneninteraktion begründet sein, die das Öffnen des N1N2-Fragments und damit eine Wechselwirkung mit TolA erschweren. Um dies zu überprüfen, wurde die Mutation R29W, die an der Domänengrenzfläche lokalisiert ist, in das disulfidverbrückte G3P* im Phagen eingebaut und die Phageninfektiosität untersucht. Der Phage ist deutlich weniger infektiös, im Vergleich zu G3P* war nur 1 % der Infektiosität vorhanden. Das gereinigte N1N2-Fragment dieser disulfidverbrückten R29W G3P*-Variante ist stark stabilisiert (Stöckl, 2005), so daß die geringe Infektiosität dieser Variante auf eine verbesserte Domänenassoziation zurückzuführen ist.

3.1.12 Bedeutung des disulfidfreien G3P* für Proside

Mit der Entwicklung eines stabilen, disulfidfreien G3P* sollte auch der Anwendungsbereich des *Proside*-Selektionssystems erweitert werden. Da Gastproteine, die selbst Disulfidbrücken oder freie Cysteine enthalten, häufig Disulfidbrücken mit den Cysteinen des G3P* bilden, geht in diesen Fällen die Infektiosität der Phagen verloren. Mit einem disulfidfreien G3P* sollte dieses Problem beseitigt werden. Der Vergleich der Infektiositäten von Phagen mit 3SS-, 2SS-, 1SS- und 0SS-G3P*-Varianten (3.1.11) belegt den Erhalt der Funktion des G3P. Ein Vergleich der Infektiositäten von 3SS-G3P*-Phagen und 0SS-G3P* mit cysteinhaltigem Gastprotein sollte Aufschluß über den Effekt der Disulfidbrücken auf die Infektiosität geben. Als Gastprotein wurde Carrageenase gewählt. Dieses Enzym zur Spaltung des Polysaccharids Carrageen besteht aus 276 Aminosäuren und besitzt eine Disulfidbrücke. Phagen mit disulfidverbrücktem G3P* und eingebautem Gastprotein Carrageen sind in ihrer Infektiosität stark eingeschränkt (Phagentiter $\sim 10^5$ cfu/ml). Ersetzt man die beiden Cysteine der Carrageenase durch Serin, so können wieder infektiöse Phagen erhalten werden (Phagentiter: $2,3 \cdot 10^8$ cfu/ml). 0SS-G3P*-Phagen sollten auch mit cysteinhaltiger Carrageenase als Gastprotein infektiös bleiben. In diesem Fall unterscheiden sich die Titer von Phagen mit Wildtyp-Carrageenase als Gastprotein nicht von der Infektiosität der Phagen mit der cysteinfreien Variante des Gastproteins (Phagentiter: Carrageenase Wildtyp: $4 \cdot 10^7$ cfu/ml, Carrageenase C98S / C268S: $4,8 \cdot 10^7$ cfu/ml). Für 0SS-G3P*-Phagen macht es demnach keinen Unterschied, ob das Gastprotein Disulfidbrücken enthält oder cysteinfrei vorliegt. Die geringere Infektiosität der 0SS-G3P*-Phagen wurde bereits in 3.1.11 erläutert. Dieser Vorteil der 0SS-G3P*-Phagen ist auch für andere Anwendungen des Phage-Display von Bedeutung (1.5.2), da Wechselwirkungen mit Cysteinen häufig die Selektion limitieren.

3.2 Struktur und Analyse der Beiträge einzelner Mutationen zur Stabilität des disulfidfreien G3P

Das stabilisierte disulfidfreie G3P* aus 3.1 wurde von R. Jakob (Bayreuth) kristallisiert und die Struktur gelöst. Auf der Grundlage der Kristallstruktur einerseits und einer Vielzahl analytischer Einzel- und Kombinationsvarianten von 0SS-G3P* andererseits wurden die Beiträge der *second-site*-Mutationen zur Stabilität und Struktur analysiert.

3.2.1 Analytische 0SS-G3P*-Varianten

Im Verlauf der Selektion disulfidfreier G3P*-Varianten wurden stabilisierende Mutationen sowohl in der N1- als auch in der N2-Domäne identifiziert. Ein generelles Prinzip von *Proside* ist, wie bereits erwähnt, die Stabilisierung des labilsten Teils des Proteins. Beim Verlust der Disulfidbrücken in N1 wird diese Domäne extrem stark destabilisiert. *Second-site*-Mutationen, die durch Zufallsmutagenese selektiert wurden, müssen den Stabilitätsverlust durch den Disulfidbrückenersatz kompensieren, so daß Mutationen in N1 einen beachtlichen Effekt auf die Gesamtstabilität des G3P* haben. Die Mutationen im stabilisierten disulfidfreien G3P* sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Analyse der individuellen Beiträge zur Stabilität erfordert die Konstruktion und Untersuchung vieler Einzelvarianten im 0SS-G3P*-Hintergrund. Die entsprechenden Varianten wurden überexprimiert, gereinigt und ihre Stabilitäten bestimmt. Die Schmelzpunkte der Varianten sind in Tabelle 3.7 zusammengestellt, ihre thermischen Entfaltungsübergänge sind in Abbildung 3.14 a/b gezeigt. Die thermischen Entfaltungsübergänge aller Einzelvarianten sind im Gegensatz zum zweiphasigen Entfaltungsübergang des Wildtyp-Proteins hochkooperativ. Wie in 3.1.3 ist auch in diesem Fall N1 durch die Substitution von zwei Disulfidbrücken so stark destabilisiert, daß die Entfaltung gekoppelt mit der Domänenendissoziation und der Entfaltung von N2 abläuft. Die Beiträge der Mutationen zur Stabilität der N1-Domäne allein können in diesem Fall also nicht bestimmt werden. Die Expression entsprechender isolierter N1-Domänen ist für die 0SS-G3P*-Einzelvarianten nur schwer möglich, weil sie zu instabil sind. Entsprechende Expressionsversuche für verschiedene N1-Domänen mit einzelnen Mutationen sind fehlgeschlagen. Nur für die Variante R29W 0SS-G3P* konnte N1 isoliert exprimiert und charakterisiert werden (Stöckl, 2005). Der Vergleich der thermischen Übergänge zeigt für die Einzelvarianten mit Mutationen in N1 die stärkste Stabilisierung durch die Mutation R29W ($\Delta T_m = 14,0\text{ °C}$ im Vergleich zu 0SS-G3P*). Einen großen stabilisierenden Effekt haben ebenso die Mutationen N15G und N39K. Die Mutationen T13I, G55A und I60V stabilisieren ebenfalls, allerdings weniger stark, und die Mutation T56I hat nur einen kleinen Effekt auf die Proteinstabilität.

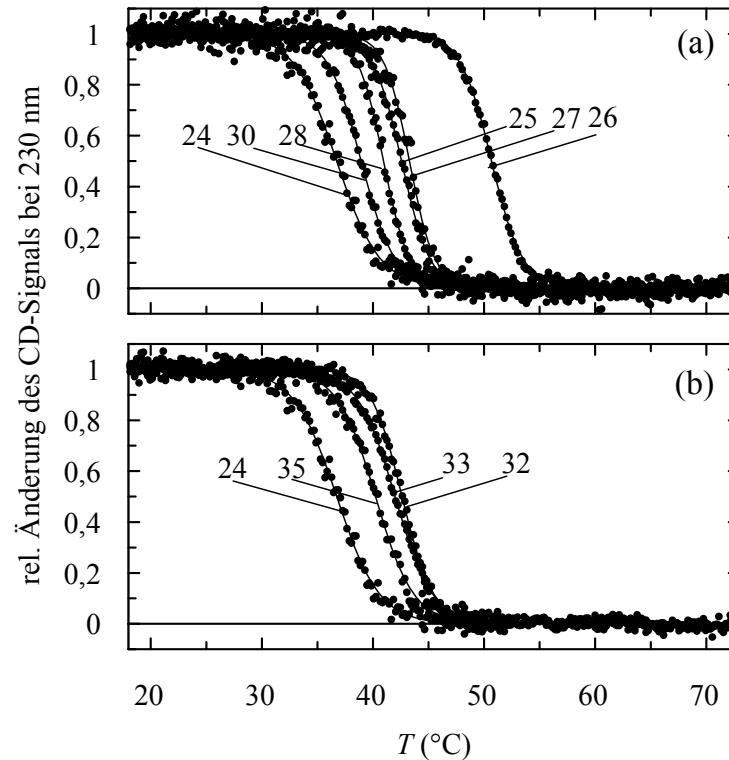


Abbildung 3.14: Thermische Stabilität der Einzelvarianten im OSS-G3P*-Hintergrund. (a) Dargestellt sind die Einzelvarianten mit Mutationen in N1, OSS-G3P* (24), I60V (30), G55A (28), N15G (25), N39K (27) und R29W (26). (b) Dargestellt sind die Varianten mit Mutationen in N2, OSS-G3P* (24), F199L (35), L198P (33) und N138G (32). Die relative Änderung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Die im Wildtyp-Protein labilere Domäne N2 wurde in ersten Selektionen (Martin und Schmid, 2003b) durch die Mutationen Q129H im globulären Teil und T101Y und D209Y in der Gelenk-Subdomäne stark stabilisiert. Substitution der Disulfidbrücke und anschließende Zufallsmutagenese führten zur Identifizierung der Mutationen N138G, L198P, F199L und S207L. Im Hintergrund von OSS-G3P* (enthält die Mutationen T13I, T101I, Q129H und D209Y) zeigen auch diese Einzelvarianten einen hochkooperativen Entfaltungsübergang, wobei die Mutation N138G den größten Effekt auf die Stabilität hat ($\Delta T_m = 5,9$ °C), gefolgt von den Mutationen L198P und F199L.

Tabelle 3.7: Stabilitätsdaten für Wildtyp-G3P, 0SS-G3P* und alle analytischen Einzel- und Kombinationsvarianten.

Nr.	G3P* Variante	N1N2-Fragment		isol. N1
		T_m (N2)	T_m (N1)	T_m (°C)
1	Wildtyp	48,5	60,0	62,4
24	0SS G3P*		36,7	
25	0SS G3P* N15G		42,6	
26	0SS G3P* R29W		50,7	
27	0SS G3P* N39K		43,3	
28	0SS G3P* G55A		41,0	
29	0SS G3P* T56I		38,1	
30	0SS G3P* I60V		38,9	
31	0SS G3P* P65H		37,3	
32	0SS G3P* N138G		42,6	
33	0SS G3P* L198P		42,0	
34	0SS G3P* L198V		40,5	
35	0SS G3P* F199L		40,2	
36	0SS G3P* S207L		38,9	
19	0SS G3P* R29W/N39K	53,2	63,0	62,6
37	0SS G3P* R29W/N39K/T56I	53,5	67,1	
38	0SS G3P* R29W/N39K/T56I/L198P	57,6	68,4	
39	0SS G3P* R29W/T56I		50,3	
40	0SS G3P* R29W/L198P		56,3	
41	0SS G3P* R29W/N39K/F199L	55,1	64,7	62,6
42	0SS G3P* N39K/T56I		41,9	
43	0SS G3P* T56I/L198P		41,8	
44	0SS G3P* N39K/V53A/P65H/N138G/F199L		53,7	
45	0SS G3P* N39K/V53A/P65H/N138G/L198V/F199L		54,2	
20	0SS G3P* R29W/N39K/G55A/I60V/F199L	58,1	70,4	67,9
21	0SS G3P* N15G/R29W/ N39K/G55A/F199L	60,1	75,2	77,5
46	0SS G3P* N15G/R29W/N39K/T56I/N138G/L198P/F199L/ S207L	66,0	75,5	
23	0SS G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V/ N138G/L198P/F199L/S207L	67,0	78,7	79,0
47	3SS-G3P* R29W	65,6	75,9	

Angegeben sind die Schmelztemperaturen (T_m) für alle 0SS-G3P*-Varianten. Die T_m -Werte für die N1- bzw. N2-Domäne sind die Mittelpunkte des ersten (N2) bzw. zweiten (N1) Übergangs im biphasischen Entfaltungsübergang des N1N2-Fragments nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell. Die T_m -Werte der isolierten N1-Domänen sind die Mittelpunkte der einphasigen Entfaltung von N1 nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell. Für die 0SS-G3P*-Einzelvarianten sind die Übergänge nicht zu trennen. In diesem Fall sind apparente T_m -Werte angegeben, die die Hälfte der Signaländerung angeben. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die N2-Domäne eine konstante Wärmekapazitätsänderung von $\Delta C_p = 10\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ und für die N1-Domäne ein konstantes ΔC_p von $1\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ angenommen. Die zugehörigen Entfaltungsenthalpien sind im Anhang in Tabelle 9.3 aufgeführt. Die Nummerierung der Varianten dient der Identifizierung der Varianten in den Abbildungen in 3.2, die Daten für die Variante 3SS-G3P* R29W wurden von M. Stöckl im Rahmen einer Diplomarbeit erarbeitet (Stöckl, 2005).

Durch die Kombination der Mutationen in N1 und N2 können die Beiträge einzelner Mutationen in verschiedenen Hintergründen bestimmt werden. Aus dem Vergleich der Varianten können dann Rückschlüsse auf die Additivität der Beiträge bzw. eventuelle Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren gezogen werden. In einem thermodynamischen Zyklus (Mutationszyklus) können entsprechende Wechselwirkungen identifiziert werden. Da hier jedoch ein komplexes Modell zur Entfaltung des Zweidomänenproteins vorliegt, welches sich für die verschiedenen Varianten je nach Stabilität der beiden Domänen ändert, kann nur ein Vergleich über die Schmelzpunkte der Varianten erfolgen. Ein Vergleich der freien Enthalpien ist aufgrund der Problematik des richtigen Entfaltungsmodells nicht möglich. In Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16 sind die Varianten zusammenfassend dargestellt. Abbildung 3.15 zeigt nur den Zusammenhang der Varianten mit Mutationen an den Positionen 29, 39, 56 und 198, und in Abbildung 3.16 sind neben den Einzelvarianten die selektierten 0SS-G3P*-Varianten dargestellt. Die Differenz der T_m -Werte gibt in beiden Schemata den stabilisierenden Beitrag der jeweiligen Mutation an.

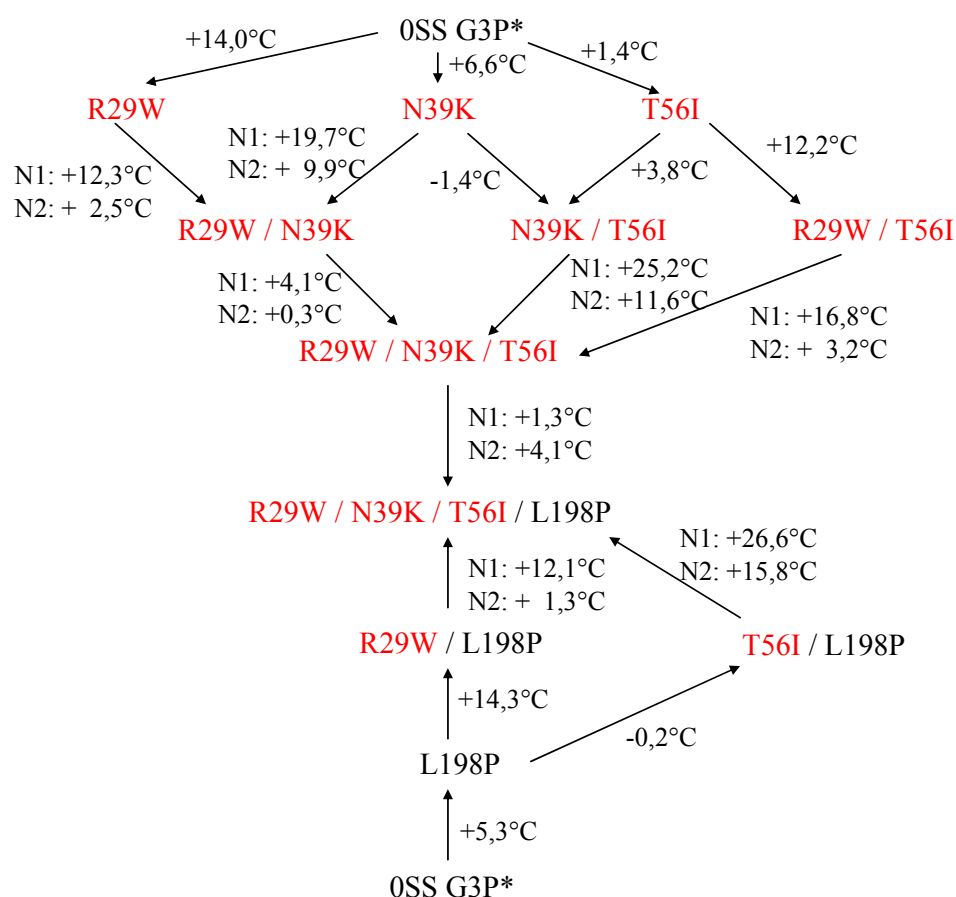


Abbildung 3.15: Schema zur Analyse der stabilisierenden Effekte der *second-site*-Mutationen in N1 und N2. Zusammenhang der Varianten mit Mutationen an den Positionen 29, 39, 56 und 198. Mutationen in N1 sind in **rot** dargestellt, Mutationen in N2 in schwarz. Angegeben ist der Unterschied der Übergangsmittelpunkte der thermischen Entfaltung der Varianten (ΔT_m). Bei Varianten, bei denen die Entfaltung hochkooperativ verläuft, ist die Temperatur bei der Hälfte der Signaländerung angegeben, für Varianten mit einem Dreizustandsübergang sind die Differenzen der Schmelzpunkte für beide Domänen angegeben.

Betrachtet man zunächst die Einzelbeiträge der Mutationen in N1, so wird der enorm stabilisierende Effekt der Mutation R29W deutlich. Während N39K ebenfalls einen großen Beitrag zur Stabilisierung beider Domänen leistet, ist für die Mutation T56I praktisch fast kein stabilisierender Effekt erkennbar. Die Beiträge der Mutationen sind in diesem Fall auf beide Domänen bezogen, da ein hochkooperativer Entfaltungsvorgang vorliegt. Der Effekt auf die N1-Domäne allein kann nicht unabhängig analysiert werden. Die N1-Domäne 0SS-G3P* N39K konnte nicht als gefaltetes Protein isoliert werden, die N1-Domäne 0SS-G3P* R29W liegt bei Raumtemperatur gefaltet vor, ist jedoch mit einem T_m von etwa 36 °C sehr instabil (Stöckl, 2005). Der Vergleich der Varianten R29W / T56I und T56I zeigt ebenfalls die starke Stabilisierung durch R29W. Die Kombinationsvariante ist genauso stabil wie 0SS-G3P* R29W, T56I hat hier keinen Einfluß auf die Stabilität. Bestätigt wird dies ebenfalls beim Vergleich der Kombinationsvarianten N39K / T56I mit den jeweiligen Einzelvarianten. In Kombination stabilisieren die Mutationen R29W und N39K die Domäne N1 so stark, daß diese getrennt von N2 bei 63 °C entfaltet. Auch die isolierte Domäne N1 mit diesen beiden Mutationen ist stabil und entfaltet bei 62,6 °C. Durch den Vergleich der Varianten R29W / T56I bzw. N39K / T56I mit der Variante R29W / N39K / T56I wird der stark stabilisierende Einfluß der jeweiligen zusätzlichen Mutation in N1 auf diese Domäne deutlich (ΔT_m der N1-Domänen). Der Einfluß auf die N2-Domäne durch die betrachteten Mutationen in N1 ist gering.

In Domäne N2 hat die Mutation L198P einen großen stabilisierenden Effekt ($\Delta T_m = 5,3$ °C). Der Vergleich mit R29W / L198P zeigt die Additivität der Beiträge von L198P und R29W. Die Differenz der Schmelzpunkte ergibt den Einzelbeitrag der Mutation R29W. Insgesamt wird beim Vergleich dieser Varianten mit hochkooperativem Übergang die gute Additivität der Beiträge der Einzelmutationen sehr deutlich.

Zusätzlich zu den in Abbildung 3.15 aufgeführten 0SS-G3P*-Varianten sind in Abbildung 3.16 alle Einzelmutationen aus der Selektion für die Domänen N1 und N2 dargestellt. In diesem Schema werden vor allem die 0SS-G3P*-Varianten verglichen, bei denen die N1-Domäne so stabil ist, daß die beiden Entfaltungsübergänge entkoppelt sind. Dabei werden die Einflüsse der Mutationen auf die Stabilität der einzelnen Domänen besonders deutlich. Bei der Kombination von R29W / N39K mit der Mutation F199L in N2 wird die N2-Domäne um 3,2 °C stabilisiert. Die Mutationen N15G und G55A stabilisieren vor allem die N1-Domäne bei Kombination mit der Variante R29W / N39K / F199L ($\Delta T_m = 10,5$ °C). Zusätzlich ist bei diesen Varianten auch eine Stabilisierung der N2-Domäne feststellbar, wie auch für die Kombination G55A / I60V im R29W / N39K / F199L-Hintergrund. Besonders deutlich wird der stabilisierende Beitrag dieser Domänen, wenn man die Differenz der Einzelvarianten (N15G + G55A bzw. G55A + I60V) mit den Kombinationen dieser Mutationen mit R29W / N39K / F199L betrachtet. Durch den unterschiedlichen Entfaltungsmechanismus der Einzelvarianten (hochkooperative Entfaltung der Domänen) und den Kombinationsvarianten

(zweiphasige Entfaltungsreaktion) ist nur ein qualitativer Vergleich möglich, da bei den Einzelvarianten der genaue Effekt auf die einzelnen Domänen nicht bestimmbar ist.

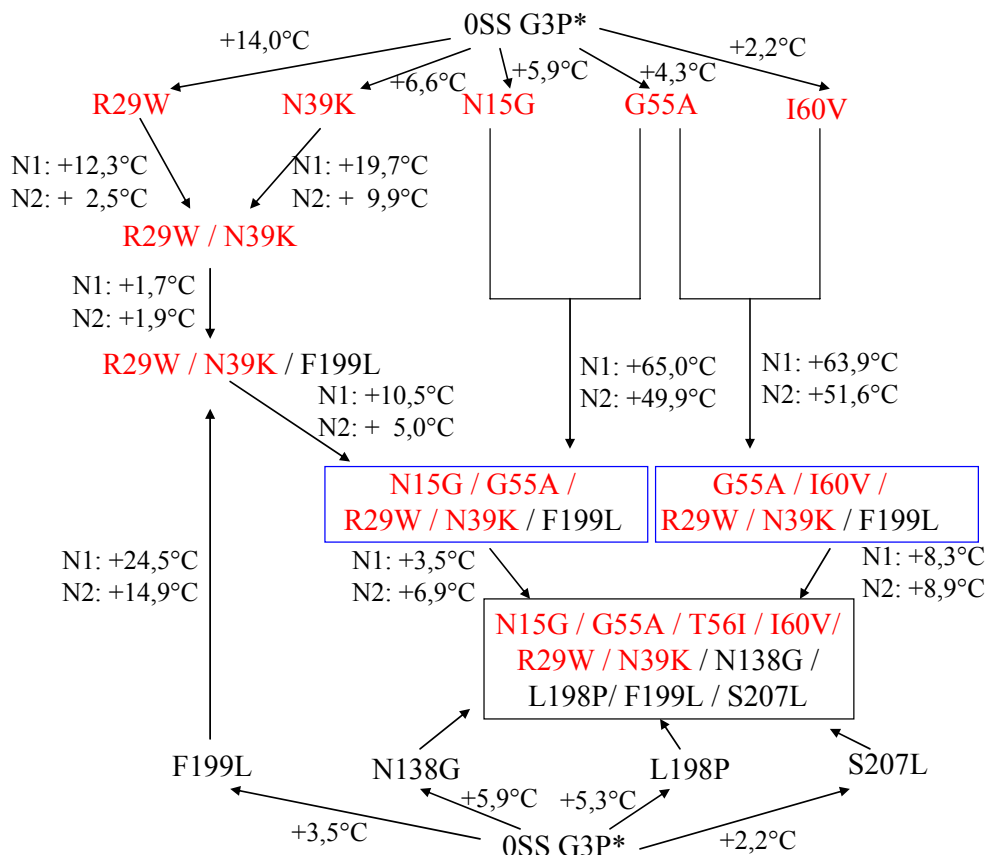


Abbildung 3.16: Schema zur Analyse der stabilisierenden Effekte der *second-site*-Mutationen in N1 und N2. Zusammenhang der Varianten mit Mutationen in N1 und N2. Mutationen in N1 sind in rot dargestellt, Mutationen in N2 in schwarz. Die stabilsten 0SS-G3P*-Varianten aus der Selektion sind blau umrahmt, die disulfidfreie Variante mit allen stabilisierenden Mutationen ist schwarz umrahmt. Angegeben ist der Unterschied der Übergangsmittelpunkte der thermischen Entfaltung der Varianten (ΔT_m). Bei Varianten, bei denen die Entfaltung hochkooperativ verläuft, ist die Temperatur bei der Hälfte der Signaländerung angegeben, für Varianten mit einem Dreizustandsübergang sind die Differenzen der Schmelzpunkte für beide Domänen angegeben.

Der Vergleich der beiden stabilsten Varianten aus der Selektion (siehe Abbildung 3.16, blau umrahmt) mit der Kombinationsvariante mit allen stabilisierenden Mutationen (siehe Abbildung 3.16, schwarz umrahmt) zeigt die zusätzliche Stabilisierung der N2-Domäne durch die drei zusätzlichen Mutationen (N138G, L198P und S207L), wobei die stabilisierenden Beiträge der einzelnen Mutationen im Vergleich zu den Mutationen in N1 deutlich geringer sind (N2 wird insgesamt um 6,9 °C bzw. 8,9 °C stabilisiert). N1 wird im Vergleich zu den selektierten Varianten jeweils durch zwei Mutationen verändert. Die stabilsten Varianten aus der Selektion unterscheiden sich nur in den Mutationen N15G und I60V in N1. Der Unterschied der T_m -Werte zwischen diesen Varianten und der Kombinationsvariante ist damit den Mutationen I60V bzw. N15G zuzuordnen (N1 ist um 3,5 °C bzw. 8,3 °C stabilisiert). Ein Effekt der Mutationen in N1 auf die Stabilität der Domäne N2 und umgekehrt ist schwer zu bestimmen, da die Komplexität der Dreizustandsübergänge, die Änderung des Anteils der

Entfaltung von N2 an der gesamten Signaländerung und die geringe Kooperativität der N1-Domäne ohne Disulfidbrücken die Auswertung dieser Übergänge erschwert. Ein Vergleich der T_m -Werte von N1 im N1N2-Fragment mit den T_m -Werten der isolierten N1-Domänen zeigt jedoch eine relativ gute Übereinstimmung und läßt daher auf eine hohe Verlässlichkeit der Daten schließen.

3.2.2 Stabilitätsuntersuchungen mittels verschiedener Sonden

Das CD-Signal bei 230 nm ändert sich bei der Entfaltung beider Domänen, N1 und N2. Wie bereits erwähnt, erschweren dabei der geringe und je nach Variante unterschiedliche Anteil von N2 am Gesamtsignal sowie die geringe Kooperativität der N1-Domänen die Auswertung. Deshalb ist es wichtig, weitere Sonden für die Untersuchung der konformationellen Stabilität der 0SS-G3P*-Varianten zu verwenden. Da die Tyrosinreste hauptsächlich in der N2-Domäne lokalisiert sind, kann anhand der Tyr-Absorption bei 286 nm die Entfaltung der N2-Domäne separat beobachtet werden. Anhand der Trp-Absorption bei 296 nm können beide Übergänge beobachtet werden. Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der thermischen Stabilität eines Proteins ist die Kalorimetrie (DSC), bei der die zur Entfaltung benötigte Enthalpie gemessen wird. Da N2 mit 131 Aminosäuren die deutlich größere Domäne ist, wird für diese Domäne ein hohes Signal erhalten. N1 liefert aufgrund seiner geringen Kooperativität und Größe (68 Aminosäuren) nur ein kleines Signal. Mittels der verschiedenen Methoden besteht damit die Möglichkeit, die thermische Stabilität der beiden Domänen zuverlässig zu bestimmen. Durch zusätzliche Untersuchungen mit der isolierten N1-Domäne kann der Beitrag dieser Domäne zusätzlich identifiziert werden. Die N2-Domäne wurde in dieser Arbeit nicht als isolierte Domäne analysiert, da die Entfaltung von N2 generell an die Domänen dissoziation gekoppelt ist und damit nicht mit den Daten für die isolierte Domäne vergleichbar ist.

Die Analyse der konformationellen Stabilität mehrerer Varianten erfolgte mittels dieser verschiedenen Sonden. Beispielhaft sind hier die Entfaltungsübergänge der Varianten 2SS-G3P* C188A / C201L (Domänen N1 und N2 unterscheiden sich deutlich in ihrer Stabilität) in Abbildung 3.17 und 0SS-G3P* N15G / G55A / R29W / N39K / F199L (stabilste 0SS-G3P*-Variante aus der Selektion) in Abbildung 3.18 bzw. Abbildung 3.19 dargestellt.

Die Stabilitätsdaten für die thermische Entfaltung der Variante 2SS-G3P* C188A / C201L sind in Tabelle 3.8 zusammengefaßt. Die Schmelzpunkte für die beiden Domänen aus den verschiedenen thermischen Entfaltungsübergängen stimmen gut überein. Der Übergangsmittelpunkt der N2-Domäne aus der Absorptionsmessung bei 286 nm ist mit 46,2 °C etwas niedriger als der mittels CD bestimmte Schmelzpunkt (48,1 °C). Dieser Übergangsmittelpunkt ergibt sich auch aus der Analyse der Absorptionsdaten bei 296 nm gemäß einem Dreizustandsmodell (T_m (N2) = 46,3 °C). Der T_m -Wert der N1-Domäne kann anhand dieser Daten zu 66,4 °C bestimmt werden, was mit dem T_m -Wert aus den CD-Daten (T_m (N2) = 66,1 °C) übereinstimmt. Die DSC-Messung ergab für N2 einen T_m -Wert von 48,9 °C und für N1 einen T_m -Wert von 68,0 °C.

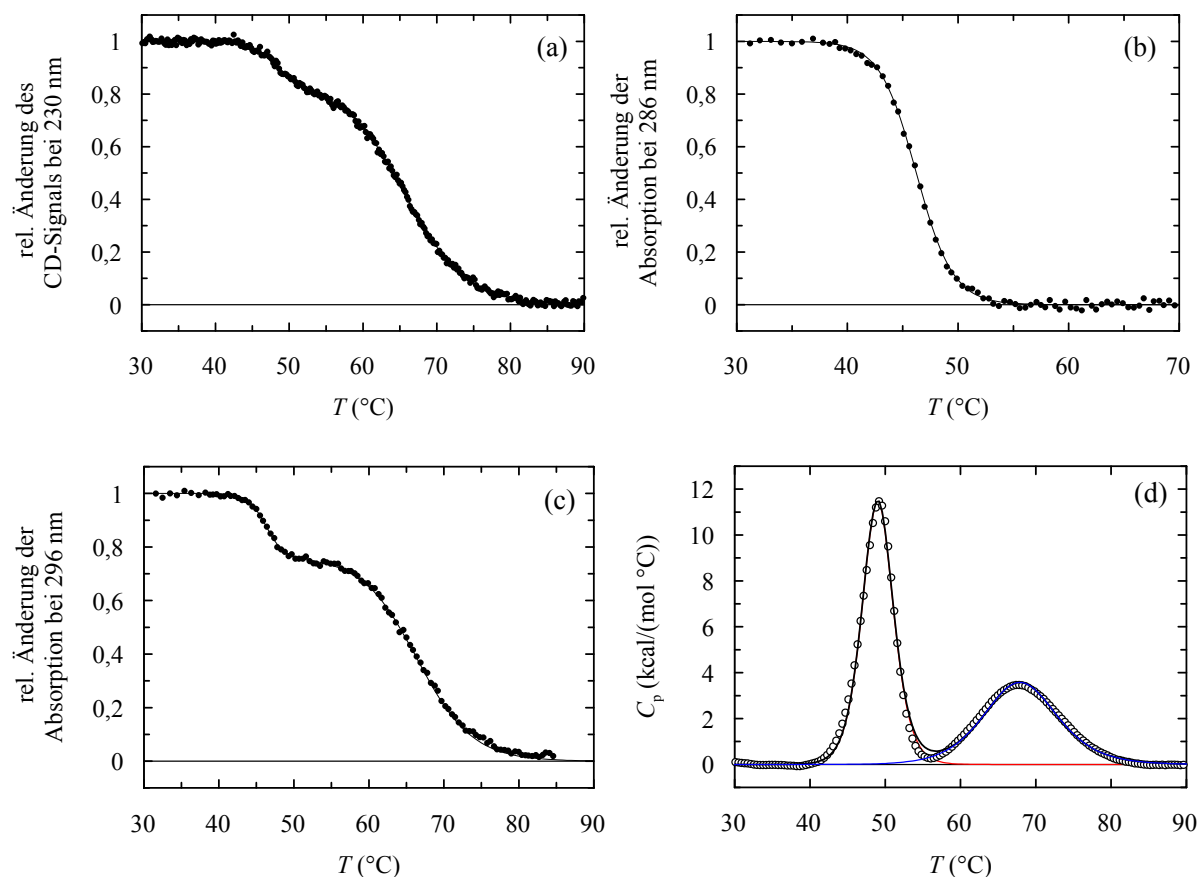


Abbildung 3.17: Thermisch-induzierte Entfaltung von 2SS-G3P* C188A/C201L. (a) Die Entfaltung von N1 und N2 wurde anhand des CD-Signals bei 230 nm mit 4 μM Protein gemessen. (b) Die Entfaltung von N2 wurde mit 10 μM Protein anhand der Tyrosin-Absorption bei 286 nm gemessen. (c) Die Entfaltung von N1 und N2 wurde mit 10 μM Protein anhand der Tryptophanabsorption bei 296 nm gemessen. Die Schichtdicke bei (a)-(c) betrug 1 cm. (d) Die Entfaltung von N1 und N2 wurde anhand der Änderung der Wärmekapazität bei thermischer Entfaltung gemessen. Die Messung erfolgte mit 50 μM Protein. Alle Messungen wurden in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 durchgeführt. Die durchgezogenen Linien zeigen Angleiche an die Daten gemäß einem Dreizustandsmodell (a, c) bzw. gemäß einem Zweizustandsmodell (b). In (d) gibt die durchgezogene Linie das Ergebnis der Levenberg-Marquardt-Analyse nach dem Nicht-Zweizustandsmodell wieder, und die rote und blaue Linie repräsentieren die Dekonvolution in zwei unabhängige Entfaltungsübergänge für die Domänen N1 und N2. Die zugehörigen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Für die stabilste selektierte 0SS-G3P*-Variante N15G / G55A / R29W / N39K / F199L wurde die thermische Entfaltung ebenfalls mit vier verschiedenen Sonden gemessen (Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 bzw. Tabelle 3.8). Auch in diesem Fall stimmen die erhaltenen T_m -Werte gut überein. Außerdem wurden mit den einzelnen Sonden für N1 im N1N2-Fragment und als isolierte Domäne sehr ähnliche Werte erhalten.

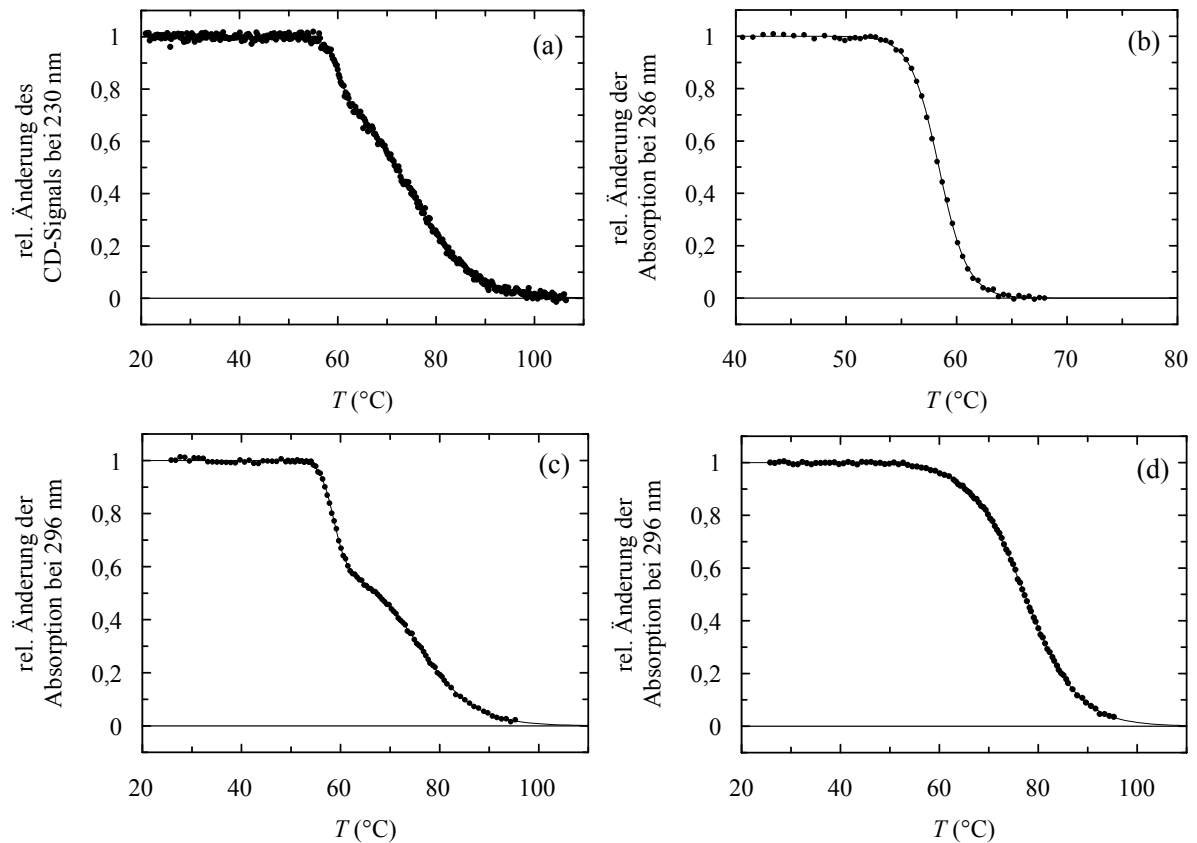


Abbildung 3.18: Thermisch-induzierte Entfaltung von OSS-G3P* N15G/G55A/R29W/N39K/F199L. (a) Die Entfaltung von N1 und N2 wurde anhand des CD-Signals bei 230 nm mit 4 μ M Protein gemessen. (b) Die Entfaltung von N2 wurde mit 10 μ M Protein anhand der Tyrosin-Absorption bei 286 nm gemessen. (c) Die Entfaltung von N1 und N2 wurde anhand der Tryptophanabsorption bei 296 nm gemessen. (d) Die Entfaltung der isolierten N1-Domäne wurde mit 10 μ M Protein anhand der Absorption bei 296 nm gemessen. Alle Messungen wurden in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 durchgeführt. Die durchgezogenen Linien zeigen Angleiche an die Daten gemäß einem Dreizustandsmodell (a, c) bzw. gemäß einem Zweizustandsmodell (b, d). Die zugehörigen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Für die beste selektierte Variante wurde die Stabilität des N1N2-Fragments und der isolierten N1-Domäne auch mittels DSC analysiert. Abbildung 3.19 zeigt sowohl die Änderung der Wärmekapazität bei der Entfaltung von N1N2 bzw. isolierter N1-Domäne (a, b) als auch die integrierten Daten dieser Entfaltungsreaktion und damit die Enthalpieänderung (c, d).

Die DSC-Messungen ergeben Schmelzpunkte von 61,0 °C für N2 bzw. 73,8 °C für N1 im N1N2-Fragment. Auch diese Daten stimmen gut mit den aus CD und Absorption erhaltenen Werten überein (Tabelle 3.8). Für die isolierte N1-Domäne liegt der T_m bei 79,1 °C. Da die Enthalpieänderung für die N1-Domäne sehr klein ist und die Basislinien unsicher sind, ist dieser Wert sehr ungenau.

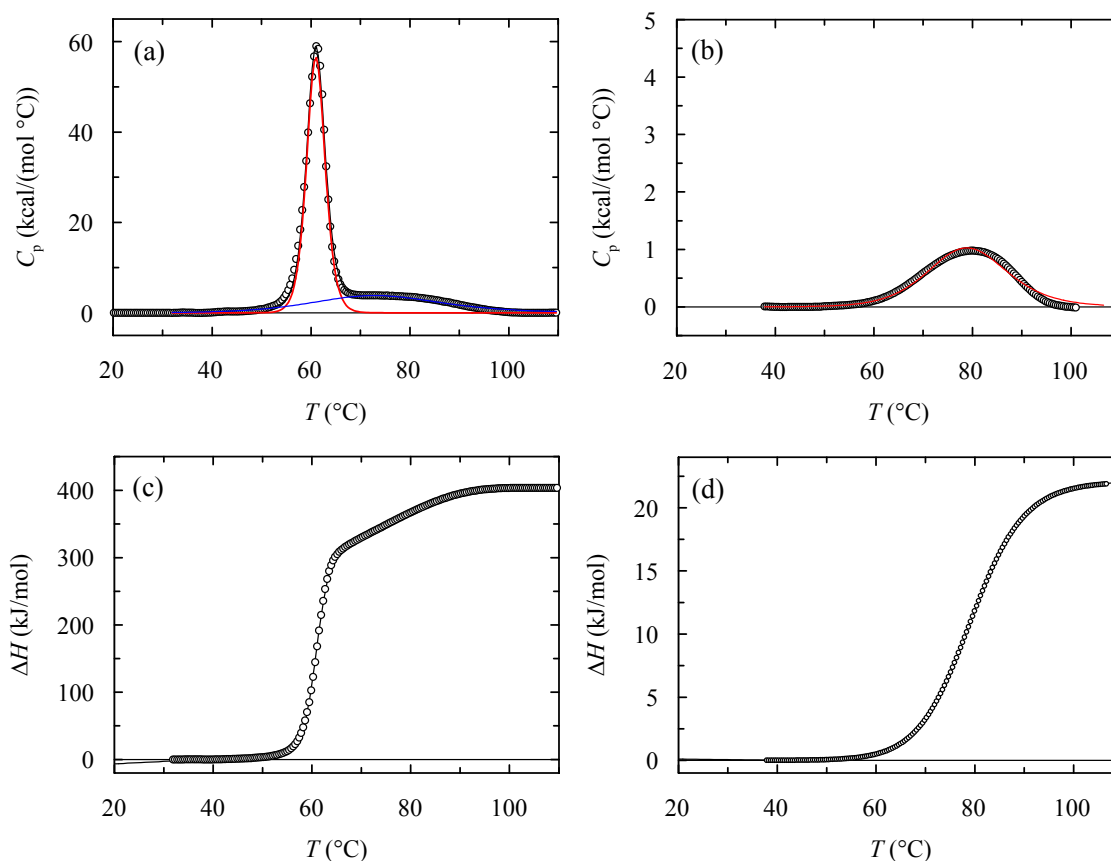


Abbildung 3.19: Thermisch-induzierte Entfaltung von 0SS-G3P* N15G/G55A/R29W/N39K/F199L mittels DSC. (a) Änderung der Wärmekapazität bei der thermischen Entfaltung des N1N2-Fragments, (b) Änderung der Wärmekapazität bei der thermischen Entfaltung der isolierten N1-Domäne, (c) Enthalpieänderung für N1N2, (d) Enthalpieänderung für die isolierte N1-Domäne. Die Messung wurde mit 50 μ M (N1N2-Fragment) bzw. 183 μ M (isolierte N1-Domäne) des Proteins in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Heizrate von 90 K/h durchgeführt. In (a) und (b) gibt die durchgezogene Linie das Ergebnis der Levenberg-Marquardt-Analyse nach dem Nicht-Zweizustandsmodell wieder, und die rote und blaue Linie repräsentieren die Dekonvolution in zwei unabhängige Entfaltungsübergänge für die Domänen N1 und N2. Die durchgezogene Linie zeigt in (c) den Angleich an die Daten gemäß einem Dreizustandsmodell bzw. in (d) gemäß einem Zweizustandsmodell. Die zugehörigen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Für die 0SS-G3P*-Kombinationsvariante mit allen stabilisierenden Mutationen (Variante 23, Tabelle 3.7) ist die Analyse der N1-Domäne generell schwierig, weil der T_m von N1 sehr hoch und die Kooperativität der Entfaltung sehr niedrig ist. Die Stabilität der N2-Domäne konnte wegen der großen Enthalpieänderung sehr gut mittels DSC gemessen werden. Abbildung 3.20 zeigt die thermische Entfaltung dieser Variante verfolgt mittels verschiedener Sonden. Die zugehörigen Stabilitätsdaten sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Die Übergangsmittelpunkte für die N2-Domäne korrelieren gut, die Entfaltungsenthalpie aus dem CD-Übergang ist höher als bei der Absorptions- und DSC-Messung. Dies ist vermutlich auf die geringe Änderung des CD bei der Entfaltung von N2 zurückzuführen (vgl. Abbildung 3.20a).

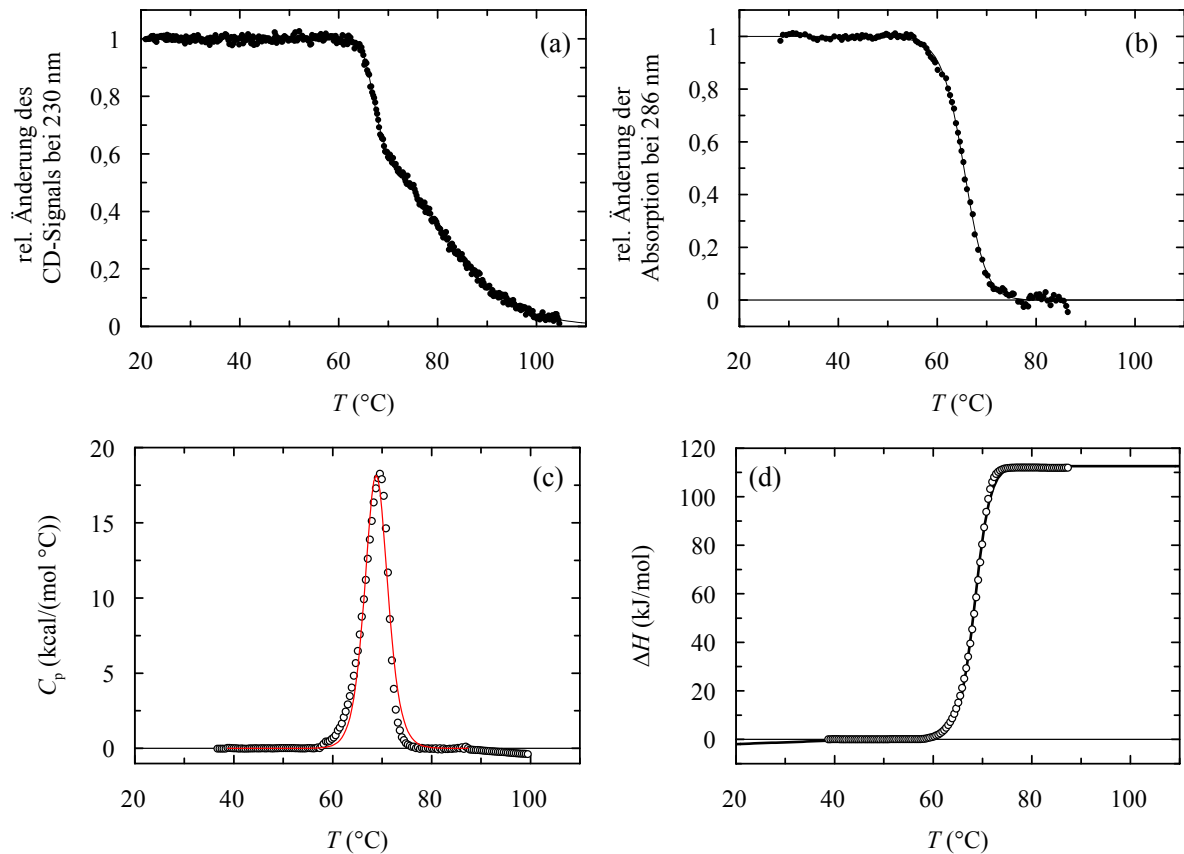


Abbildung 3.20: Thermisch-induzierte Entfaltung von OSS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen. (a) Die Entfaltung von N1 und N2 wurde anhand des CD-Signals bei 230 nm mit 4 μM Protein gemessen. (b) Die Entfaltung von N2 wurde mit 10 μM Protein anhand der Tyrosin-Absorption bei 286 nm gemessen. (c) Änderung der Wärmekapazität bei der thermischen Entfaltung des N1N2-Fragments ($c(\text{Protein}) = 105 \mu\text{M}$). (d) Enthalpieänderung für N1N2. Alle Messungen wurden in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 durchgeführt. Die Linien zeigen Angleiche an die Daten gemäß einem Dreizustandsmodell (a) bzw. gemäß einem Zweizustandsmodell (b, d). In (c) gibt die durchgezogene Linie das Ergebnis der Levenberg-Marquardt-Analyse nach dem Nicht-Zweizustandsmodell wieder. Die zugehörigen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.8 zusammengefaßt.

Die Stabilitätsdaten für die thermische Entfaltung der verschiedenen 3SS-, 1SS- bzw. 0SS-G3P*-Varianten beobachtet mittels verschiedener Sonden sind in Tabelle 3.8 zusammengefaßt. Generell stimmen die T_m -Werte aus CD-, DSC- und Absorptionsmessungen gut überein. Auch die Enthalpiewerte der Entfaltung korrelieren bei Messung mit verschiedenen Sonden relativ gut. Im Fall der N2-Domäne (im N1N2-Fragment) ist die Kooperativität der Übergänge ähnlich. Die Untersuchung der konformationellen Stabilität der Varianten mit verschiedenen Sonden läßt auf eine hohe Verlässlichkeit der Daten schließen. Dies zeigt, daß die Stabilitätsdaten für die einzelnen Mutanten zuverlässig sind.

Tabelle 3.8: Vergleich der Stabilitätsdaten von verschiedenen 3SS-, 2SS-, 1SS- und 0SS-G3P*-Varianten aus CD-, Absorptions- und DSC-Messungen.

Nr.	G3P-Variante	CD N2			Absorption N2		DSC N2	
		T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	ΔG_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)
1	Wildtyp	48,0	621	-14,2	-	-	48,9	652
2	G3P*	61,2	640	11,3	-	-	62,2	665
3	2SS C188A/C201L	48,1	521	-11,9	46,2	515	49,0	629
14	1SS V2	60,6	654	10,44	60,7	923	-	-
20	0SS G55A/I60V/ R29W/N39K/F199L	58,1	761	6,9	-	-	58,5	652
21	0SS N15G/G55A/ R29W/N39K/F199L	60,1	670	9,8	58,4	707	61,0	674
23	0SS mit allen stab. Mutationen	67,0	852	27,9	65,2	519	67,2	634
		CD N1			Absorption N1		DSC N1	
		T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	ΔG_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)
1	Wildtyp	59,8	213	-3,3	-	-	61,8	235
2	G3P*	66,0	228	0,7	-	-	68,1	294
3	2SS C188A/C201L	65,8	233	0,5	66,4	262	68,0	294
14	1SS V2	66,4	221	0,9	-	-	-	-
20	0SS G55A/I60V/ R29W/N39K/F199L	70,4	143	2,2	-	-	71,9	271
21	0SS N15G/G55A/ R29W/N39K/F199L	75,2	167	4,7	75,8	181	73,8	276
23	0SS mit allen stab. Mutationen	78,7	135	5,0	-	-	-	-
		CD isol. N1			Absorption isol. N1		DSC isol. N1	
		T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	ΔG_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)
2	G3P*	67,5	235	1,7	64,8	236	67,7	237
19	0SS R29W/N39K	62,6	142	-1,0	-	-	62,8	109
21	0SS N15G/G55A/ R29W/N39K	77,5	188	6,5	77,3	191	79,2	194
23	0SS mit allen stab. Mutationen	79,0	202	7,8	-	-	-	-

Für die verschiedenen Varianten sind der Übergangsmittelpunkt (T_m in °C) und die Enthalpie der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D in kJ/mol angegeben. Für die Daten aus den CD-Messungen ist für die N2-Domäne die freie Enthalpie der Entfaltung $\Delta G_D^{55^\circ\text{C}}$ bei 55 °C und für die N1-Domäne $\Delta G_D^{65^\circ\text{C}}$ bei 65 °C in kJ/mol angegeben. Die Daten für G3P-Wildtyp und G3P* sind aus der Arbeit von A. Martin entnommen (Martin und Schmid, 2003b). Die Nummerierung der Varianten entspricht den Angaben in Tabelle 3.2.

3.2.3 Kooperativitätsänderungen der N1-Domänen

Für die isolierten N1-Domänen korreliert die Kooperativität des Entfaltungsübergangs mit der Anzahl der Disulfidbrücken. Dies läßt sich sowohl in der thermischen als auch in der GdmCl-induzierten Entfaltung beobachten, ΔH_D bzw. der m -Wert ist für die disulfidfreien Varianten kleiner (Abbildung 3.21 a/b). Die Abnahme der Enthalpie ΔH_D wird durch eine Änderung des ΔC_p -Wertes verursacht. Die Änderung von ΔC_p wurde durch thermische Entfaltung des Proteins in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an GdmCl gemessen. ΔC_p läßt sich aus der Abhängigkeit von ΔH_D von der Schmelztemperatur bestimmen. Da sich der ΔC_p -Wert

jedoch auch in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration ändert (Pfeil und Privalov, 1976; Makhatadze und Privalov, 1992), sind die erhaltenen ΔC_p -Werte nicht absolut, sondern relativ zum Vergleich der Varianten untereinander zu betrachten (Abbildung 3.21 a). Die Varianten mit einer oder zwei Disulfidbrücken besitzen einen identischen ΔC_p -Wert von $\sim 4500 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$. Für N1-Varianten ohne Disulfidbrücke ist ΔC_p hingegen deutlich verringert ($\Delta C_p \sim 2800 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) (Tabelle 3.9).

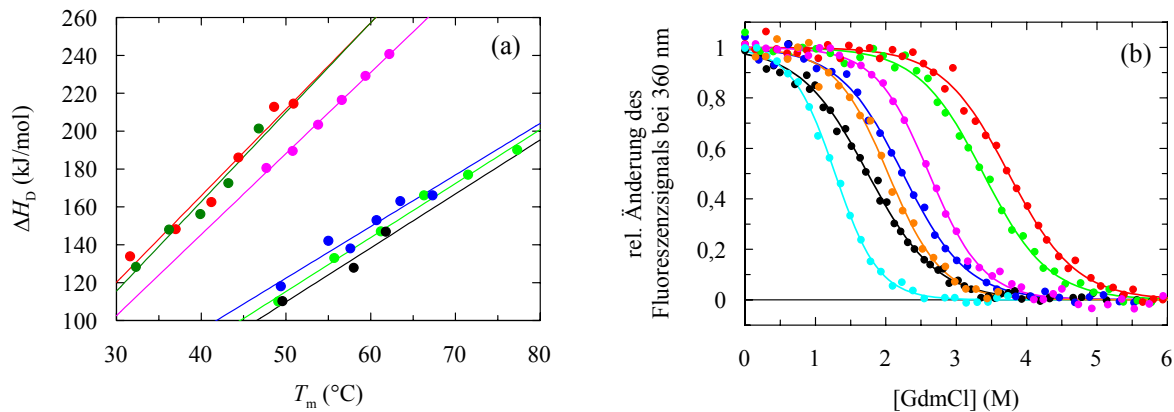


Abbildung 3.21: Kooperativität der N1-Domänen mit zwei, einer oder ohne Disulfidbrücken. (a) Bestimmung der Wärmekapazitätsänderung ΔC_p aus der Abhängigkeit der Enthalpie ΔH_D von den Schmelztemperaturen bei thermischer Entfaltung in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an GdmCl. G3P-Wildtyp (1, \blacklozenge), 1SS-G3P* C46G/C53I (8, \bullet), 1SS-G3P* C46A/C53V (10, \bullet), 0SS-G3P* R29W/N39K (19, \bullet), 0SS-G3P* R29W/N39K/G55A/I60V (20, \bullet), 0SS-G3P* R29W/N39K/N15G/G55A (21, \bullet). Die Übergänge wurden mit $3 \mu\text{M}$ Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 und unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen gemessen und gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet. (b) GdmCl-induzierte Entfaltung der 2SS-, 1SS- und 0SS-G3P*-Varianten. G3P-Wildtyp (1, \blacklozenge), 1SS-G3P* C46A/C53L (7, \bullet), 1SS-G3P* C46I/C53V (11, \bullet), G3P* R29W/N39K (19, \bullet), 0SS-G3P* R29W/N39K/G55A/I60V (20, \bullet), 0SS-G3P* R29W/N39K/N15G/G55A (21, \bullet) und 0SS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V (23, \bullet). Die Übergänge wurden mit $0,5 \mu\text{M}$ Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei variierender GdmCl-Konzentration bei 25°C und 10 mm Schichtdicke anhand der Fluoreszenzänderung bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen. Aufgetragen ist die relative Änderung des Fluoreszenzsignals nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell.

In Tabelle 3.9 sind die Daten für die ΔC_p -Bestimmung der N1-Domänen mit unterschiedlicher Disulfidbrückenanzahl zusammengefasst. Der Kooperativitätsparameter m der GdmCl-induzierten Entfaltungsübergänge zeigt ein ähnliches Ergebnis wie der Vergleich der ΔH_D -Werte aus den thermischen Entfaltungen. Der m -Wert ist für die 0SS-G3P* N1-Domänen im Vergleich zu den Varianten mit einer oder zwei Disulfidbrücken ebenfalls deutlich reduziert. Da in den 0SS-G3P*-Varianten durch den Ersatz der Disulfidbrücke C7-C36 die N-terminale Helix nicht mehr strukturiert vorliegt (3.2.6), ist die kooperative Einheit kleiner, und ΔH_D , ΔC_p und m sind im Vergleich zu den 2SS- und 1SS-Varianten verringert.

Tabelle 3.9: Kooperativität der Entfaltung von N1-Domänen mit unterschiedlicher Zahl an Disulfidbrücken.

Nr.	N1 G3P* -Variante	T_m (°C)	ΔH_D (kJ mol ⁻¹)	ΔC_p (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)
1	Wildtyp	62,4	244	4280	6,5
2	G3P*	67,5	235		8,9
7	1SS C46A/C53L	46,6	192		7,3
8	1SS C46G/C53I	47,2	193	4725	
10	1SS C46A/C53V	49,1	229	4570	
11	1SS C46I/C53V	55,2	235		
19	0SS R29W/N39K	62,6	142	2850	5,1
20	0SS R29W/N39K /G55A/I60V	67,9	172	2720	5,3
21	0SS R29W/N39K/N15G/G55A	77,5	188	2850	5,4
23	0SS N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V	74,8	173		5,2

Angegeben sind die Schmelzpunkte der N1-Domänen, die Reaktionsenthalpie ΔH_D und die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p aus den thermischen Entfaltungsübergängen. Außerdem ist der m -Wert der GdmCl-induzierten Entfaltung der verschiedenen G3P*-Varianten angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte in beiden Fällen gemäß einem Zweizustandsmodell. Die Nummerierung der Varianten entspricht den Angaben in Tabelle 3.2.

3.2.4 GdmCl-induzierte Entfaltung der 0SS-G3P*-Varianten

3.2.4.1 Fluoreszenzspektren der N1-Domänen mit unterschiedlicher Anzahl an Disulfidbrücken

GdmCl-induzierte Entfaltungsübergänge der 0SS-G3P*-Varianten wurden anhand von Änderungen der Proteinfluoreszenz gemessen. Der Vergleich der Fluoreszenzspektren von nativem und denaturiertem Protein aller N1-Domänen ermöglicht die Festlegung der als Meßsonde verwendeten Wellenlängen für jedes einzelne Protein und, durch den Vergleich der Varianten, die Bestimmung des Beitrags einzelner Aminosäuren zum Fluoreszenzsignal. Abbildung 3.22 zeigt die Fluoreszenzspektren nach Anregung bei 280 nm für natives und denaturiertes Protein (a) bzw. die Differenzspektren für alle N1-Domänen (b).

Der Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren zeigt eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität bei den 0SS-G3P*-Varianten mit einem zusätzlichen Tryptophan in der N1-Domäne (R29W). Die Intensität ist für die N1-Domäne mit allen stabilisierenden Mutationen am größten. Nach Anregung bei 280 nm ergibt sich ein Spektrum mit einem Fluoreszenzmaximum bei 340 nm im nativen Protein. Im entfalteten Protein nimmt die Fluoreszenz aufgrund der Exponierung der aromatischen Aminosäuren zu, und das Maximum verschiebt sich zu höheren Wellenlängen (360 nm). Betrachtet man die Differenzspektren der Varianten, so fällt auf, daß W29 vor allem bei kürzeren Wellenlängen (320 nm) zur Fluoreszenz beiträgt. In diesem Bereich ändert sich das Differenzspektrum sehr stark im Vergleich zu den Varianten ohne W29 (G3P-Wildtyp und 1SS-G3P* C46G / C53I).

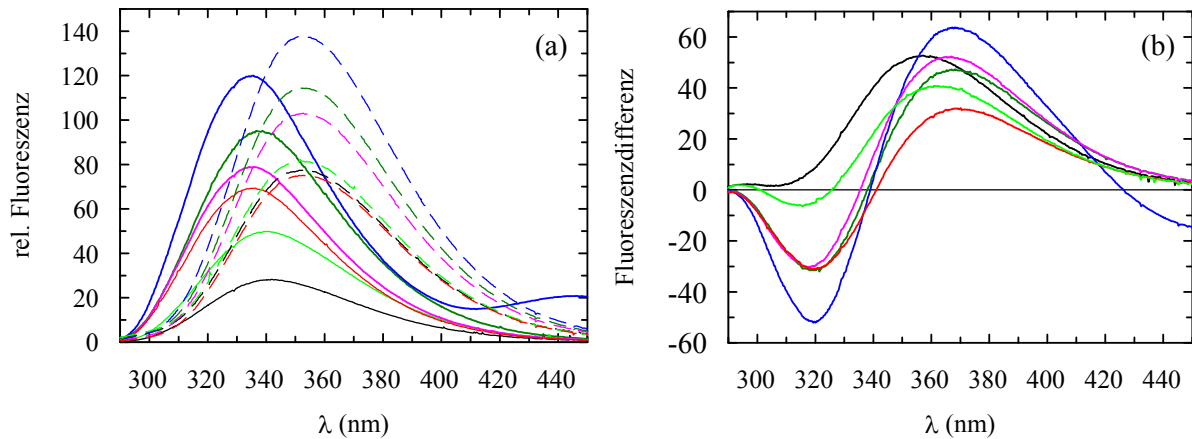


Abbildung 3.22: (a) Fluoreszenzspektren der 2SS-, 1SS und 0SS-G3P*-N1-Domänen nach Anregung bei 280 nm. Dargestellt sind die Spektren in 0 M GdmCl (durchgezogene Linie) und 6 M GdmCl (gestrichelte Linie). (b) Differenzspektren von nativem und denaturiertem Protein. Dargestellt sind die Spektren von G3P Wildtyp (—), 1SS-G3P* C46G/C53I (—), 0SS-G3P* R29W/N39K (—), 0SS-G3P* R29W/N39K/G55A/I60V (—), 0SS-G3P* R29W/N39K/N15G/G55A (—) und 0SS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V (—). Die Spektren wurden mit 1 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0, 25 °C, bei 1 cm Schichtdicke und einer Geschwindigkeit von 120 nm / min gemessen (Bandbreiten 5 nm (Anregung) bzw. 10 nm (Emission)).

3.2.4.2 Fluoreszenzspektren der N1N2-Fragmente der 0SS-G3P*-Varianten

Die Fluoreszenzemissionsspektren von 1SS-G3P*, 0SS-G3P* und 0SS-G3P* R29W / N39K / F199L nach Anregung bei 280 nm bzw. 295 nm sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

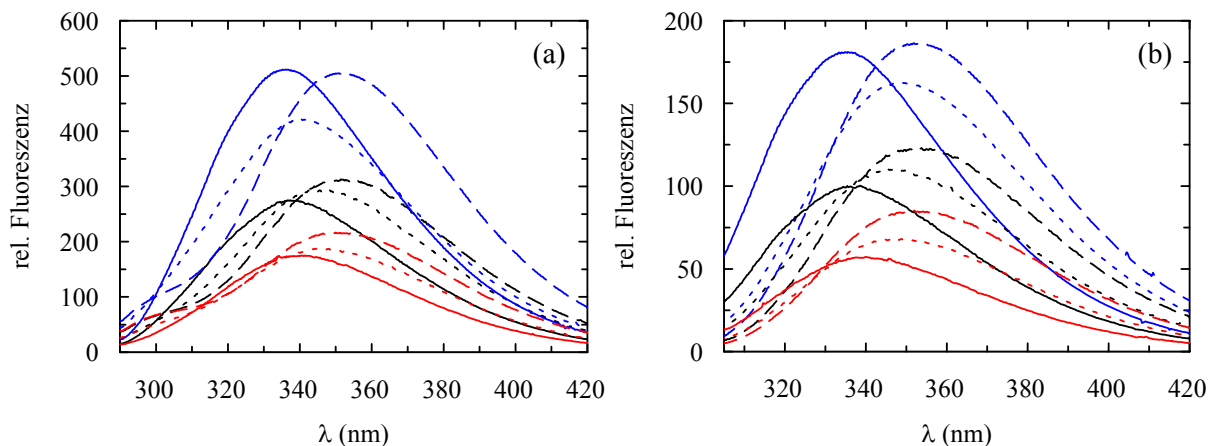


Abbildung 3.23: Fluoreszenzemissionsspektren von 0SS-G3P* R29W/N39K/F199L (—), 0SS-G3P* (—) und 1SS-G3P* (—) nach Anregung bei (a) 280 nm und (b) 295 nm. Es wurden Spektren des Proteins in 0 M GdmCl (durchgezogene Linie) bzw. in Gegenwart von 2 M bzw. 3 M (für R29W/N39K/N15G/G55A/F199L) (gepunktete Linie) und 6 M GdmCl (gestrichelte Linie) gemessen. Die Spektren wurden mit 1 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm bei 25 °C gemessen. Die Geschwindigkeit betrug 120 nm/min, die Bandbreiten 5 nm (Anregung) bzw. 10 nm (Emission).

Die Spektren der N1N2-Fragmente zeigen bei Entfaltung eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu höheren Wellenlängen und eine Zunahme der Fluoreszenzintensität. Wie bereits in 3.1.4 erläutert, können im Wildtyp-Protein und im disulfidverbrückten G3P* durch die Verteilung der aromatischen Aminosäuren die beiden Domänen getrennt beobachtet werden. Die Tyr-Fluoreszenz bei 310 nm dient als Sonde für N2, die Trp-Fluoreszenz bei

360 nm als Sonde für N1. Für die 0SS-G3P*-Varianten kann die Entfaltung der N2-Domäne durch Beobachtung der Tyrosinfluoreszenz nicht separat betrachtet werden. Im Differenzspektrum ergibt sich die größte Fluoreszenzänderung bei 320 nm. Bei dieser Wellenlänge ist die Entfaltung beider Domänen durch die Betrachtung von Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz beobachtbar. Die Entfaltung der N1-Domäne kann, ebenso wie bei 3SS-G3P, bei den 0SS-G3P*-Varianten durch Betrachtung der Tryptophanfluoreszenz bei 360 nm nach selektiver Anregung der Tryptophane bei 295 nm erreicht werden. Da in Domäne N2 mit W181 auch ein Tryptophan vorhanden ist, kann hier aber keine selektive Sonde erhalten werden.

3.2.4.3 GdmCl-induzierte Entfaltung der 0SS-G3P*-Varianten

Wie bereits anhand der Fluoreszenzspektren beschrieben, gibt es für die 0SS-G3P*-Varianten keine Wellenlängen, bei denen sich die Entfaltung von N1 und N2 separat beobachten lassen. In Abbildung 3.24 sind die GdmCl-induzierten Entfaltungsübergänge der 0SS-Varianten dargestellt. Die Fluoreszenzänderung bei 320 bzw. 360 nm zwischen nativem und denaturiertem Protein, also die Größe des Übergangs, unterscheidet sich für die verschiedenen Varianten und stimmt mit den Änderungen der Fluoreszenzintensität aus den Spektren überein. Bei 320 nm erhält man für alle betrachteten Varianten einen zweiphasigen Übergang. Dies entspricht den Ergebnissen der thermischen Entfaltung. Die Übergangsmittelpunkte für die Entfaltung von N2 und N1 aus dem Dreizustandsübergang bei 320 nm und dem über die Tryptophanfluoreszenz betrachteten Entfaltungsübergang von N1 stimmen gut überein. Bei Betrachtung der Fluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm ist der geringe Beitrag der N2-Domäne durch W181 in N2 erkennbar, wobei sich das Signal hier in entgegengesetzter Richtung ändert. Die thermodynamischen Daten der GdmCl-induzierten Entfaltung sind in Tabelle 3.10 aufgeführt.

Die Variante 0SS-G3P* R29W / N39K / F199L besitzt im thermischen Übergang einen T_m -Wert von 56,4 °C für N2 und von 67,2 °C für N1, ist jedoch bei GdmCl-induzierter Entfaltung instabiler als erwartet. Die N1-Domäne dieser Variante hat einen Übergangsmittelpunkt von 1,74 M GdmCl und ist damit in GdmCl instabiler als die N2-Domäne und auch instabiler als das Wildtyp-Protein bei GdmCl-Entfaltung. Thermische Übergänge in Gegenwart von NaCl haben gezeigt, daß die Stabilität der Variante nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Proteinoberfläche beeinflusst wird. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein ist der m -Wert hier niedriger. Thermische Entfaltungsübergänge in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an GdmCl bestätigen, daß die N2-Domäne in Gegenwart von 1,75 M noch gefaltet vorliegt, wohingegen die N1-Domäne entfaltet. GdmCl-induzierte Entfaltung der isolierten N1-Domäne bestätigt die geringe Stabilität in diesem Denaturierungsmittel.

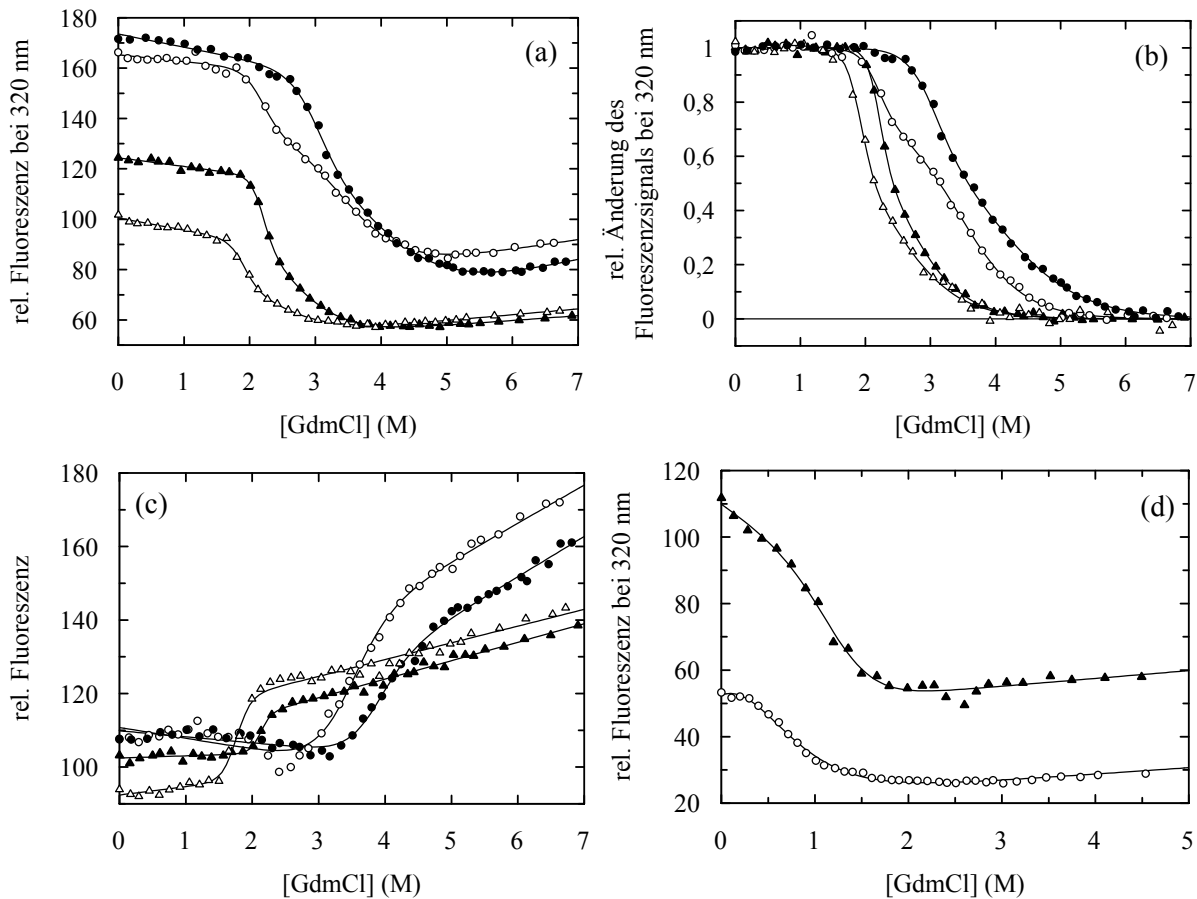


Abbildung 3.24: GdmCl-induzierte Entfaltungsübergänge der OSS-G3P*-Varianten. (a)-(c) R29W/N39K/F199L (Δ , Variante 41), R29W/N39K/G55A/I60V/F199L (\blacktriangle , Variante 20), N15G/R29W/N39K/G55A/F199L (\circ , Variante 21) und N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V/N138G/L198P/F199L/S207L (\bullet , Variante 23). (a) Fluoreszenz bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. (b) Normierte Auftragung der GdmCl-induzierten Entfaltung. (c) Fluoreszenz bei 360 nm bzw. 370 nm nach Anregung bei 280 nm in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. (d) Fluoreszenz bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration für OSS-G3P* (\circ) und OSS-G3P* T56I (\blacktriangle). Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Übergänge wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen (Bandbreiten: 5 nm (Anregung) bzw. 10 nm (Emission)).

Für die Variante OSS-G3P* R29W / N39K / G55A / I60V / F199L ergibt sich das gleiche Phänomen wie für die Variante OSS-G3P* R29W / N39K / F199L. Die N2-Domäne ist bei der GdmCl-induzierten Entfaltung stabiler als die N1-Domäne. Die Daten aus Entfaltungsübergängen betrachtet über Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz und die Daten der GdmCl-induzierten Entfaltung der isolierten N1-Domäne bestätigen dieses Ergebnis. Für diese beiden Varianten ist die Kooperativität des Übergangs der N1-Domäne stark verändert. Es ergibt sich damit die Frage, ob in diesem Fall der angenommene Entfaltungsmechanismus zutrifft.

Tabelle 3.10: Thermodynamische Daten aus der GdmCl-induzierten Entfaltung der 0SS-G3P* N1N2-Fragmente.

Nr.	G3P-Variante	Entfaltung von N2 (ex 280 nm/em 320 nm)			Entfaltung von N1 (ex 280 nm/em 320 nm)		
		m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)
2	G3P*	14,9	37,2	2,5	-	-	-
24	0SS-G3P*	6,6	0,7	0,1	-	-	-
29	0SS T56I	9,4	11,7	1,2	-	-	-
41	0SS R29W/N39K/F199L	8,1	16,9	2,1	-	-	-
20	0SS R29W/N39K/ G55A/I60V/F199L	23,2	51,5	2,2	5,3	13,3	2,5
21	0SS R29W/N39K/ N15G/G55A/F199L	16,5	36,0	2,2	5,1	17,4	3,4
23	0SS N15G/R29W/N39K/ G55A/T56I/N138G/ L198P/F199L/S207L	10,4	31,6	3,1	3,8	15,1	4,0

Nr.	G3P-Variante	Entfaltung von N1 (ex 280 nm/em 370 nm)			Entfaltung von N1 (ex 295 nm/em 370 nm)		
		m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)
2	G3P*	8,9	28,6	3,2	-	-	-
41	0SS R29W/N39K/F199L	22,7	39,9	1,8	26,1	45,3	1,7
20	0SS R29W/N39K/ G55A/I60V/F199L	31,6	65,9	2,1	41,6	86,9	2,1
21	0SS R29W/N39K/ N15G/G55A/F199L	8,3	28,5	3,4	6,5	21,4	3,3
23	0SS N15G/R29W/N39K/ G55A/T56I/N138G/ L198P/F199L/S207L	9,7	36,9	3,8	7,2	25,2	3,5

Angegeben sind der Kooperativitätsparameter m in $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$, die freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit des Denaturierungsmittels $\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ in kJ/mol und die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_{1/2}$ in M. Die Daten beziehen sich auf die Entfaltung des N1N2-Fragments bei verschiedenen Wellenlängen für Anregung (ex) und Emission (em). Für die Varianten 0SS-G3P* und 0SS-G3P* T56I ist nur ein Übergangsmittelpunkt angegeben, da bei diesen Varianten N1 und N2 in einem hochkooperativen Vorgang entfalten. Die Daten wurden gemäß einem Dreizustandsmodell (ex 280 nm/em 320 nm) bzw. einem Zweizustandsmodell (ex 280 nm/em 360 nm und ex 295/em 360 nm) ausgewertet. Die Nummerierung der Varianten entspricht der Notation aus Tabelle 3.2.

Für die Varianten 0SS-G3P* und 0SS-G3P* T56I sind die Daten sehr unzuverlässig, da aufgrund der geringen Stabilität die Basislinie des nativen Proteins nicht festzulegen ist. Die Daten sollen hier nur als Anhaltspunkt dafür dienen, daß T56I ebenso wie bei thermischer Entfaltung zur Stabilisierung beiträgt. Dies wird vor allem bei Betrachtung der Entfaltungsübergänge in Abbildung 3.24 d deutlich. Während bei der Variante 0SS-G3P* bereits bei 1 M GdmCl die Basislinie des denaturierten Proteins erreicht ist, ist 0SS-G3P* T56I noch nicht vollständig entfaltet. Für die anderen Varianten stimmen die Kooperativitäten für N1 und N2 sehr gut mit den Daten für das disulfidverbrückte G3P* überein.

Die thermodynamischen Daten für die GdmCl-induzierte Entfaltung der N1-Domänen sind in Tabelle 3.11 aufgeführt. Die Stabilitäten der isolierten N1-Domänen stimmen gut mit den Daten aus dem N1N2-Fragmente überein. Die verringerten Kooperativitäten der disulfidfreien

Varianten wurden bereits in Abschnitt 3.2.3 diskutiert. Da die Signaländerung bei 320 nm größer ist als bei 360 nm, sind diese Daten (Kooperativität, ΔG_D) zuverlässiger.

Tabelle 3.11: Thermodynamische Daten aus der GdmCl-induzierten Entfaltung der isolierten OSS-G3P* N1-Domänen.

Nr.	G3P-Variante	Entfaltung von N1 (ex 280 nm/em 320 nm)			Entfaltung von N1 (ex 280 nm/em 360 nm)		
		m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)
1	G3P-Wildtyp	5,8	14,9	2,6	6,5	16,9	2,6
2	G3P*	-	-	-	8,9	29,2	3,3
7	1SS C46A/C53L	-	-	-	7,3	9,1	1,3
11	1SS C46I/C53V	-	-	-	3,8	8,7	2,3
19	OSS R29W/N39K	5,1	8,9	1,7	4,6	6,9	1,5
20	OSS R29W/N39K/ G55A/I60V	5,4	12,2	2,2	3,7	8,3	2,3
21	OSS R29W/N39K/ N15G/G55A	5,3	18,0	3,4	4,8	16,1	3,4
23	OSS N15G/R29W N39K/G55A/T56I/ I60V	5,2	19,6	3,8	4,0	14,9	3,7

Angegeben sind der Kooperativitätsparameter m in $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$, die freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit des Denaturierungsmittels $\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ in kJ/mol und die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_{1/2}$ in M. Die Daten beziehen sich auf die Entfaltung der isolierten N1-Domäne bei verschiedenen Wellenlängen für Anregung (ex) und Emission (em) und wurden gemäß einem Zweizustandsmodell (ex 280 nm/em 360 nm und ex 295 nm/em 360 nm) ausgewertet. Die Nummerierung der Varianten entspricht der Notation aus Tabelle 3.2.

3.2.5 Fazit der Stabilitätsuntersuchungen mit den analytischen OSS-G3P*-Varianten

Die Stabilitätsdaten der analytischen OSS-G3P*-Varianten verdeutlichen, wie stark einzelne selektierte Mutationen stabilisierend wirken, vor allem in der N1-Domäne. Die wichtigsten Mutationen sind in diesem Zusammenhang R29W und N39K. Die besonders große Stabilisierung durch R29W wird beim Vergleich der Varianten OSS-G3P* und OSS-G3P* R29W deutlich. Eine weitere Analyse dieser Stabilisierung ist schwierig, da die direkten Effekte auf die N1-Domäne und die über die Domäneninteraktion auf N2 wirkenden Einflüsse nicht zu trennen sind. Die Analyse der R29W Mutation im disulfidverbrückten Protein zeigt jedoch, daß tatsächlich beide Effekte wichtig sind. Zum einen wird die N1-Domäne durch die Mutation stark stabilisiert, zum anderen hat die Mutation einen starken Effekt auf die Domänengrenzfläche (der erste Übergang wird ebenfalls stabilisiert). Die Einzelbeiträge der stabilisierenden Mutationen sind in etwa additiv. Für eine vollständige Analyse wäre hier noch eine Vielzahl an Kombinationsvarianten erforderlich. Die Komplexität des Systems aus einer Vielzahl an Mutationen und einem veränderten Faltungsmechanismus verschiedener Varianten macht eine erschöpfende thermodynamische Analyse allerdings unmöglich.

3.2.6 Vergleich der Kristallstrukturen von Wildtyp-G3P und 0SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen

Die Kristallstruktur des N1N2-Fragments der stabilisierten disulfidfreien G3P*-Variante konnte mit einer Auflösung von 1,9 Å von Roman Jakob (Kooperation mit Prof. Dr. Holger Dobbek, Bayreuth) gelöst werden. Details zur Kristallisation und Strukturbestimmung sind im Anhang in Tabelle 9.4 zusammengefaßt. Die asymmetrische Einheit enthielt zwei verschiedene G3P*-Moleküle, die sich in der relativen Orientierung der Domänen zueinander unterscheiden. Dieses Phänomen wurde bereits bei der Kristallstruktur des Wildtyp-Proteins beobachtet (Holliger *et al.*, 1999). Es gibt zwei verschiedene Wildtyp-G3P-Strukturen, nämlich die des Phagen M13 (*pdb-file* 1G3P, Lubkowski *et al.*, 1998) und die des Phagen fd (*pdb-file* 2G3P, Holliger *et al.* 1999). Das in dieser Arbeit analysierte G3P ist weder dem G3P des Phagen fd noch dem G3P des M13-Phagen eindeutig zuzuordnen. G3P von M13 und fd unterscheiden sich lediglich in den Positionen 11 und 198. Im Vergleich zum M13-G3P enthält das fd-G3P die Mutationen S11P und L198P. Der hier für die Selektion verwendete Phage besitzt an Position 11 ein Prolin und an Position 198 ein Leucin. In der Struktur von fd-G3P sind die beiden Domänen relativ zueinander etwas anders orientiert als in M13-G3P (Holliger *et al.*, 1999) und in der Kristallstruktur des N1N2-Fragments des disulfidfreien stabilisierten G3P. Die Struktur des disulfidfreien stabilisierten G3P wurde deshalb mit der Struktur des M13-G3P überlagert, um stabilisierende Effekte der Mutationen beurteilen zu können. Der Unterschied in den beiden Kristallstrukturen wird vermutlich durch die hohe Flexibilität der Gelenkregion verursacht. Dies zeigt die Bedeutung der Gelenkregion des N1N2-Fragments. Eine konformationelle Labilität konnte bereits bei verschiedenen Proteinen viraler Infektionsprozesse festgestellt werden (Holliger *et al.*, 1999). Um die verbleibenden geringen Unterschiede in der Domänenorientierung auszugleichen, wurden die Strukturen von G3P-Wildtyp und stabilisierter 0SS-G3P*-Variante alternativ so überlagert, daß einmal die N1- und einmal die N2-Domäne optimal positioniert waren. Abbildung 3.26 zeigt die Überlagerung der Kristallstrukturen des N1N2-Fragments von Wildtyp-Protein und stabilisierter 0SS-G3P*-Variante. In der Struktur des stabilisierten disulfidfreien G3P* sind die Aminosäuren 1-9 nicht aufgelöst. Diese Reste bilden die N-terminale Helix, die im Wildtyp-Protein durch die Disulfidbrücke C7-C36 mit dem β -Strang 4 verknüpft ist. Da diese Disulfidbrücke im 0SS-G3P* durch die Aminosäuren Ser7 und Ile36 substituiert und damit die kovalente Verknüpfung zum β -Strang 4 zerstört ist, ist der N-terminale Bereich flexibler und kann offenbar keine Helix bilden.

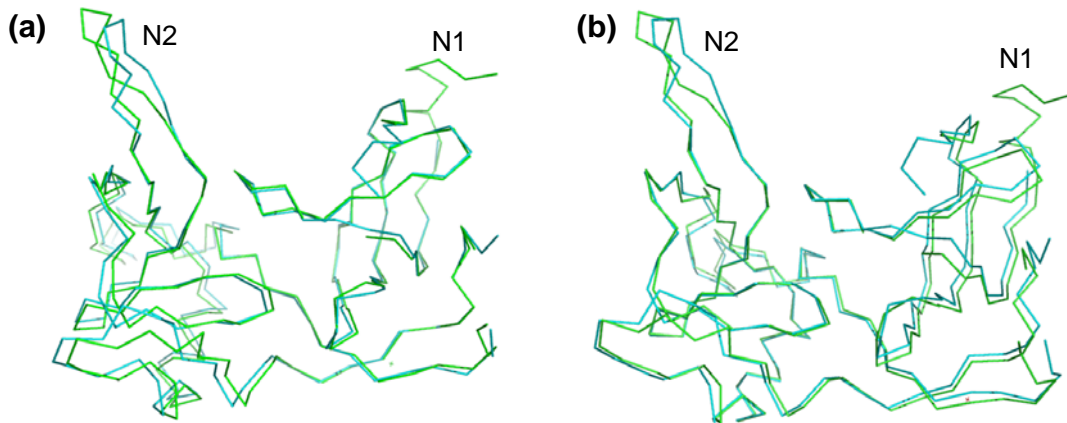


Abbildung 3.25: Vergleich der Kristallstrukturen des N1N2-Fragments von G3P-Wildtyp (grün) und stabilisierter OSS-G3P*-Variante (türkis). (a) Überlagerung des Peptidrückgrats N1-Domänen. (b) Überlagerung des Peptidrückgrats der N2-Domänen. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific, 2005) nach den Kristallstrukturdaten für Wildtyp-G3P (Lubkowski *et al.*, 1998, *pdb-file* 1G3P) und dem stabilisierten OSS-G3P* (R. Jakob, Universität Bayreuth) erstellt.

3.2.7 Strukturelle Analyse der Mutationen in der N1-Domäne

Zur Analyse der Mutationen in der Domäne N1 wurde der Strukturvergleich mit optimaler Überlagerung der N1-Domänen herangezogen (Abbildung 3.25a). In Abbildung 3.26 sind die Bereiche der Mutationen in der N1-Domäne markiert. Abbildung 3.27 zeigt Ausschnitte aus den überlagerten Strukturen von Wildtyp-G3P und stabilisiertem OSS-G3P*, in denen Änderungen der Struktur durch die Mutationen deutlich werden.

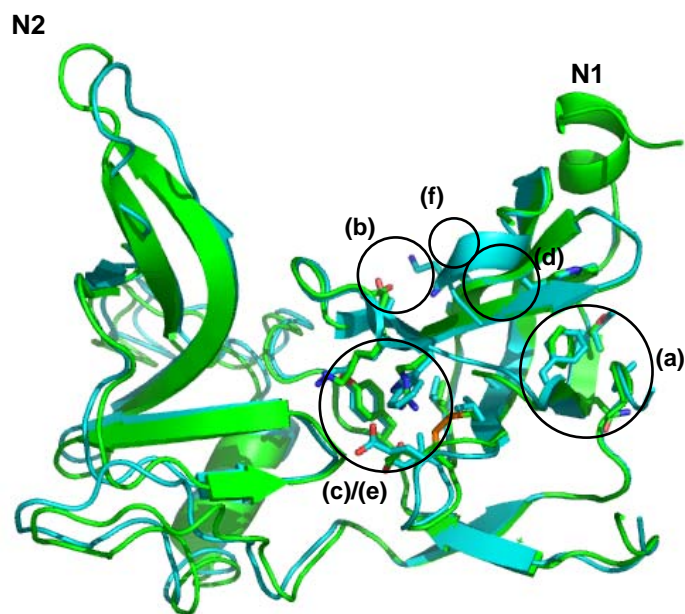


Abbildung 3.26: Vergleich der Kristallstrukturen des N1N2-Fragments von G3P-Wildtyp (grün) und stabilisierter OSS-G3P*-Variante (türkis). Die N1-Domänen wurden übereinandergelegt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific, 2005) nach den Kristallstrukturdaten für Wildtyp-G3P (Lubkowski *et al.*, 1998, *pdb-file* 1G3P) und dem stabilisierten OSS-G3P* (R. Jakob, Universität Bayreuth) erstellt. Die umrahmten Bereiche (a)-(f) sind in Abbildung 3.27 im Detail dargestellt.

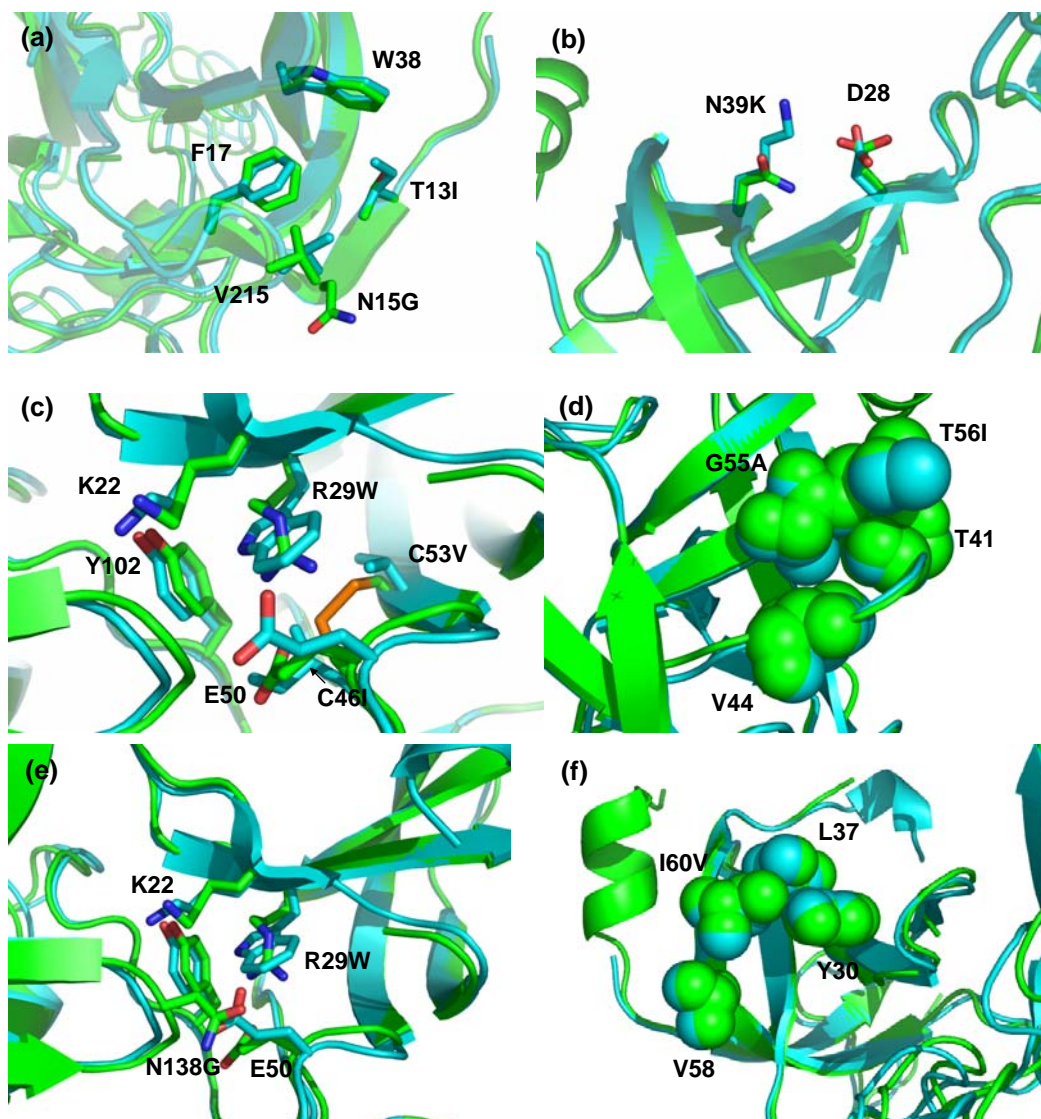


Abbildung 3.27: Ausschnitte aus den überlagerten Kristallstrukturen von Wildtyp-G3P (grün) und stabilisiertem OSS-G3P* (türkis). (a) Bereich der Mutationen N15G und T13I, (b) Bereich Mutation N39K, (c) Bereich der Mutationen R29W, C46I, C53V, (d) Bereich der Mutationen G55A und T56I, (e) Bereich der Mutation N138G, (f) Bereich der Mutation I60V. Die mutierten Reste sind im Stäbchenmodell (a-c, e) bzw. als Kalottenmodell (d, f) dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific, 2005) nach den Kristallstrukturdaten für Wildtyp-G3P (Lubkowski *et al.*, 1998, *pdb-file* 1G3P) und dem stabilisierten OSS-G3P* (R. Jakob, Universität Bayreuth) erstellt.

Positionen 13 und 15

Die Mutation T13I wurde bereits in der ersten G3P-Selektion durch Zufallsmutagenese und *Proside*-Selektion identifiziert (Martin und Schmid, 2003b) und war Bestandteil des G3P* vor Ersatz der Disulfidbrücken. An Position 15 trägt die Asn → Gly-Mutation stark zur Stabilisierung des OSS-G3P* bei ($\Delta T_m = 5,9^\circ\text{C}$). Dieser Effekt scheint kontextunabhängig zu sein, da die Mutation im bereits stabilisierten G3P* identifiziert wurde. Der Übergang der Einzelvariante ist hochkooperativ, da er die Domänendissoziation und die Entfaltung beider Domänen umfaßt. Die Erhöhung des T_m -Wertes um $5,9^\circ\text{C}$ entspricht daher einer sehr starken Stabilisierung. Die Rückgratwinkel Φ und Ψ nehmen für Asn ungünstige Werte an ($\Phi = -169^\circ$,

$\Psi = -176^\circ$). Laut Ramachandran-Auftragung ist eine solche Rückgratkonformation nur für Glycin günstig, so daß die Selektion durch die sterisch günstigere Rückgratkonformation des Gly zu begründen ist. In der Nähe des Gly15 sind Val215 und Phe17, die beide ihre Konformation nach der N15G Mutation etwas ändern. Mit dem benachbarten Ile13 (aus der T13I Mutation) bilden sie einen hydrophoben Cluster in diesem Bereich (Abbildung 3.27 a).

Position 29

Die Mutation des Arg an Position 29 zum Trp ist die am stärksten stabilisierende der *second-site*-Mutationen. Im Vergleich zum 0SS-G3P* ist diese Einzelvariante um 14,0 °C stabilisiert. Position 29 ist an der Domänengrenzfläche lokalisiert, so daß ein Effekt auf die Domäneninteraktionen zu vermuten ist (Abbildung 3.27 c). Die N2-Domäne von 0SS G3P* R29W / N39K (Variante 19, Tabelle 3.7) trägt die Mutationen T101I, Q129H, D209Y und die Disulfidbrückensubstitutionen V188 und A201. Thermische Entfaltung dieser Variante ergibt einen zweiphasigen Übergang, wobei die Entfaltung der labileren N2-Domäne mit der Domänen dissoziation gekoppelt stattfindet. Der Übergangsmittelpunkt des ersten Übergangs, also der N2-Entfaltung liegt bei 53,2 °C. Dieser Schmelzpunkt stimmt mit dem T_m der entsprechenden 2SS-G3P*-Variante (Variante 6, Tabelle 3.2) überein. Die Mutationen in N2 sind in beiden Proteinen gleich, der T_m liegt bei 53,3 °C. Der stabilisierende Effekt von Trp29 ist in unterschiedlichem Hintergrund im 0SS G3P* gleich groß. Wie bereits erwähnt, zeigt jedoch der Vergleich der Varianten 3SS-G3P* und 3SS-G3P* R29W eine Stabilisierung beider Domänen bzw. beider Entfaltungsübergänge. Dies läßt eindeutig auf einen Effekt auf die Domäneninteraktion schließen. Im Falle der Varianten 6 und 19 liegt ein weiterer Unterschied im Vorhandensein der Disulfidbrücke C46-C53 (in Variante 6 vorhanden, in Variante 19 substituiert), die ebenfalls an der Domänengrenzfläche lokalisiert ist. Die Mutation R29W und die Disulfidbrücke C46-C53 wirken vermutlich ähnlich stabilisierend auf die Domäneninteraktion.

Die Bedeutung der Wechselwirkung von W29 mit dem Disulfidbrückenersatz Ile46 / Val53 wird beim Vergleich des Stabilitätsbeitrags durch R29W im disulfidfreien und im disulfidverbrückten Protein deutlich (Varianten 24 und 26 in Tabelle 3.7 bzw. Variante 2 in Tabelle 3.2 und Variante 47 in Tabelle 3.7). Der Beitrag von Trp29 auf die Stabilität ist im disulfidfreien G3P* größer, was auf eine bessere Packung als im disulfidverbrückten Protein hinweist.

Abbildung 3.27 c zeigt die strukturellen Änderungen im Bereich der Position 29. Im Wildtyp-G3P interagiert das Arginin an Position 29 mit Glutamat an Position 50 (Abstand C=O – NH₂: 3,1 Å). Lys22 ist in für eine ionische Wechselwirkung mit Glu50 zu weit entfernt (Abstand C=O – NH₂: 8,0 Å). Der Ersatz von R29 zum W29 in Kombination mit dem Disulfidbrückenersatz I46 / V53 führt zu komplexen strukturellen Änderungen in diesem Bereich. Die Seitengruppen von Ile an Position 46 und Glu50 behindern sich gegenseitig. Glu50 ändert die Position und klappt in Richtung der Position 29. Lys22 und Glu50 sind hier

noch zu weit voneinander entfernt, um eine Salzbrücke bilden zu können (Abstand im disulfidfreien G3P*: 6 Å). Die im Wildtyp-Protein im Innern verborgene Salzbrücke zwischen Arg29 und Glu50 scheint daher ungünstig zu sein. In der stabilisierten Variante ist diese ionische Wechselwirkung durch hydrophobe Interaktionen des Trp29 mit Tyr102 und mit Ile46 / Val53 ersetzt, welche die Disulfidbrücke substituieren. Unterstützt wird diese Annahme durch die geringe Lösungsmittelzugänglichkeit der entsprechenden Aminosäuren sowohl in der Wildtyp-Struktur als auch in der Struktur der disulfidfreien Variante. Arg29 ist mit nur 2,2 % zugänglicher Oberfläche im Inneren vergraben, genauso wie der Interaktionspartner Glu50 (2,7 %). Die Disulfidbrücke C46-C53 ist komplett unzugänglich (0 % zugängliche Oberfläche). In der disulfidfreien Variante ist das Trp29 mit 1,9 % zugänglicher Oberfläche weiterhin vergraben und Glu50 mit 23,6 % zugänglicher Oberfläche deutlich exponierter.

Interessanterweise unterscheiden sich in diesem Bereich auch die Strukturen von M13-G3P und fd-G3P sehr stark. Im G3P des fd-Phagen ist Tyr102 in die entgegengesetzte Richtung gedreht und Glu50 bildet eine Salzbrücke mit Lys22 (Abstand C=O – NH₂: 2,9 Å) statt mit Arg29. Die Flexibilität der Domänen führt zu einer Veränderung der Wechselwirkungen in der Domänengrenzfläche im N1N2-Fragment. Diese Variabilität der Interaktionen der Aminosäuren in der Domänengrenzfläche verdeutlicht nochmals den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion. Um die Infektiosität des Phagen gewährleisten zu können, muß die Domänenwechselwirkung labil sein. Bestätigt wurde dieser Zusammenhang von Stabilität und Infektiosität beim Vergleich der Infektiositäten der Phagen mit unterschiedlich stabilem G3P (3.1.11).

Position 39

Position 39 ist an der Proteinoberfläche lokalisiert. Die Mutation von Asn zu Lys ist an dieser exponierten und gut zugänglichen Stelle günstig. Die Mutation stabilisiert das 0SS-G3P* um 6,6 °C. Auch in diesem Fall zeigt der Vergleich von 0SS-G3P* R29W / N39K mit der 2SS-G3P*-Variante (Variante 6, Tabelle 3.2), daß nur die Domäne N1 stabilisiert wird. Die Stabilität der N2-Domäne wird durch beide Mutationen nicht beeinflusst. Die Expression und Charakterisierung der isolierten N1-Domäne 0SS-G3P* R29W / N39K zeigt auch hier eine Übereinstimmung des T_m -Wertes mit dem des N1N2-Fragments (isolierte N1-Domäne: T_m = 62,6 °C, N1N2-Fragment: T_m = 63,0 °C). In der Nähe von Lys39 ist an Position 28 ein Aspartat (Abstand: 3,8 Å) lokalisiert (Abbildung 3.27 b), so daß hier eine Salzbrücke gebildet werden kann. Diese Salzbrücke verbindet die β -Stränge 3 und 4 des antiparallelen Faltblatts in N1.

Alle 0SS-G3P*-Varianten mit der Kombination der Mutationen R29W und N39K zeigen bei der thermischen Entfaltung wieder den zweiphasigen Übergang des Wildtyp-Proteins, d.h. die Stabilisierung ist so stark, daß nach Domänendissoziation und Entfaltung der N2-Domäne die N1-Domäne stabil bleibt und erst bei höherer Temperatur separat entfaltet. Die Kombination

der Mutation N39K mit stabilisierenden Mutationen in N2 (Varianten 44, 45, Tabelle 3.7) führt nicht zum zweiphasigen Übergang. N1 ist in diesem Fall nicht stabil genug, so daß Domänen dissoziation, Entfaltung von N2 und N1 in einem hochkooperativen Prozeß ablaufen. Die zusätzlich auftretende Mutation P65H, die in diesen Kombinationsvarianten auftritt, hat keinen Effekt auf die Stabilität der N1-Domäne.

Position 55 und 56

Die Mutation des Glycins an Position 55 zu Alanin führt zu einer Stabilisierung des Proteins um 4,3 °C. Die Φ - und Ψ -Winkel ($\Phi = 180^\circ$, $\Psi = -174^\circ$) sind für Alanin erlaubte Rückgratwinkel. Position 55 ist im β -Strang 5 lokalisiert. Thr41, Val44 und Ile56 sind in der Umgebung von Position 55. Die zusätzliche Methylgruppe des Alanins an Position 55 könnte einen Hohlraum zwischen den Resten 55 und Val44 schließen. Eine verbesserte Packung in diesem Bereich könnte ein Grund für den stabilisierenden Effekt dieser Mutation sein (Abbildung 3.27 d).

Die Mutation des polaren Threonins an Position 56 zur hydrophoben Aminosäure Isoleucin hat nur einen kleinen Effekt auf die Stabilität. Die entsprechende 0SS-G3P*-Einzelvariante zeigt nur eine geringe Stabilisierung im Vergleich zu 0SS-G3P* ($\Delta T_m = 1,4^\circ\text{C}$). Kombinationen der Mutation T56I mit verschiedenen anderen stabilisierenden Mutationen bestätigen die geringe Stabilisierung durch T56I (Tabelle 3.7). Die Mutation an Position 56 zeigt keine signifikanten strukturellen Änderungen. Position 56 befindet sich in der TolA-Bindungsstelle der N1-Domäne. Die Mutation zum Isoleucin könnte also eine Auswirkung auf die TolA-Bindung haben und damit die Infektiosität des Phagen günstig beeinflussen, was ihre Selektion erklären könnte.

Position 60

Die Mutation Ile→Val an Position 60 stabilisiert das Protein um 2,2 °C. Dieser vergleichsweise kleine Effekt wird auch im Hintergrund der übrigen stabilisierenden Mutationen deutlich. Vergleicht man die T_m -Werte der Varianten 46 und 23 (Tabelle 3.7), die sich nur in den Mutationen G55A und I60V unterscheiden, so unterscheiden sich diese in der Stabilität der N1-Domäne um 3,2 °C. Ein Vergleich der Varianten 20 und 41 aus Tabelle 3.7 zeigt das gleiche Ergebnis in anderem Hintergrund. Die entsprechenden Varianten unterscheiden sich ebenfalls in den Mutationen G55A und I60V, in diesem Fall im Hintergrund R29W / N39K / F199L 0SS-G3P*. Der T_m -Wert der N1-Domänen unterscheidet sich um 3,2 °C, der T_m -Wert der N2-Domänen um 1,7 °C. Val60 ist in der Struktur von hydrophoben Aminosäuren umgeben (Leu8, Leu37, Tyr30 und Val58) und kontaktiert außerdem die Seitenkette von Lys39. Allerdings gibt der Vergleich der Raumstrukturen keinen Hinweis darauf, warum die zusätzliche Methylgruppe von Ile60 im Wildtyp-Protein destabilisierend wirkt, insbesondere da sie lösungsmittel exponiert ist.

3.2.8 Strukturelle Analyse der Mutationen in der N2-Domäne

Für die strukturelle Untersuchung der Mutationen in der N2-Domäne des stabilisierten disulfidfreien G3P* im Vergleich zum Wildtyp-Protein wurden die N2-Domänen der Kristallstrukturen überlagert. In Abbildung 3.28 sind die Bereiche, in Abbildung 3.29 die Mutationen im Detail gezeigt.

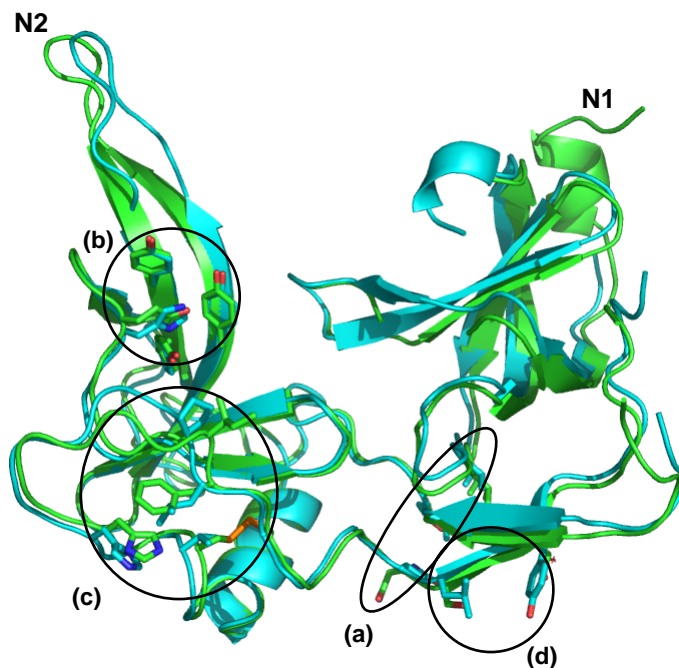


Abbildung 3.28: Vergleich der Kristallstrukturen des N1N2-Fragments von G3P-Wildtyp (grün) und stabilisierter OSS-G3P*-Variante (türkis). Die N2-Domänen wurden überlagert. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific, 2005) nach den Kristallstrukturdaten für Wildtyp-G3P (Lubkowski *et al.*, 1998, *pdb-file* 1G3P) und dem stabilisierten OSS-G3P* (R. Jakob, Universität Bayreuth) erstellt. Die umrahmten Bereiche (a)-(d) sind in Abbildung 3.29 im Detail dargestellt.

Position 101

Die Mutation T101I ist eine der Mutationen aus der evolutiven Stabilisierung des Wildtyp-G3P, und ihr stabilisierender Effekt wurde bereits im Hintergrund des Wildtyp-Proteins betrachtet (Martin und Schmid, 2003b). Diese Mutation ist am Ende des β -Strang 6 in der Gelenk-Subdomäne der N2-Domäne lokalisiert. Ile101 ist in der Nähe von zwei Valinresten lokalisiert, Val43 und Val45. Die Seitenkette von Val43 ändert ihre Konformation in Richtung des hydrophoben Isoleucin. Glu206 ist ebenso in der Nähe des Ile101. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein ist Glu206 ins Innere gedreht und nicht ganz so exponiert (Abbildung 3.29 a). Ein stabilisierender Effekt von Thr \rightarrow Ile Mutationen an Positionen nahe der Proteinoberfläche konnte auch bei der Stabilisierung der β -Domäne des Streptococcal-Proteins G beobachtet werden (Wunderlich *et al.*, 2005b). Dieser stabilisierende Effekt könnte darauf beruhen, daß Threonin im Gegensatz zu Isoleucin beim Faltungsprozeß desolvatisiert

werden muß und Isoleucin als C^β-verzweigte Aminosäure an dieser Position ebenso zu einer guten Packung führt.

Position 129

Q129H ist ebenfalls eine Mutation aus der *Proside*-Selektion des Wildtyp-Proteins (Martin und Schmid, 2003b). Die Struktur des stabilisierten OSS-G3P* bestätigt, daß der stabilisierende Effekt von Q129H auf günstigen Wechselwirkungen mit den drei umgebenden Tyrosinresten Tyr151, Tyr166 und Tyr168 beruht und daß His129 deshalb einen starken Einfluß auf die Tyr-Fluoreszenz hat (Abbildung 3.29 b). Dies wurde bereits bei der Diskussion auf der Grundlage der Wildtyp-G3P-Struktur vermutet (Martin und Schmid, 2003b). Position 129 ist im globulären Teil der N2-Domäne lokalisiert und hat keinen Kontakt zur Domänengrenzfläche. Deshalb ist nur ein Effekt auf die N2-Domäne feststellbar.

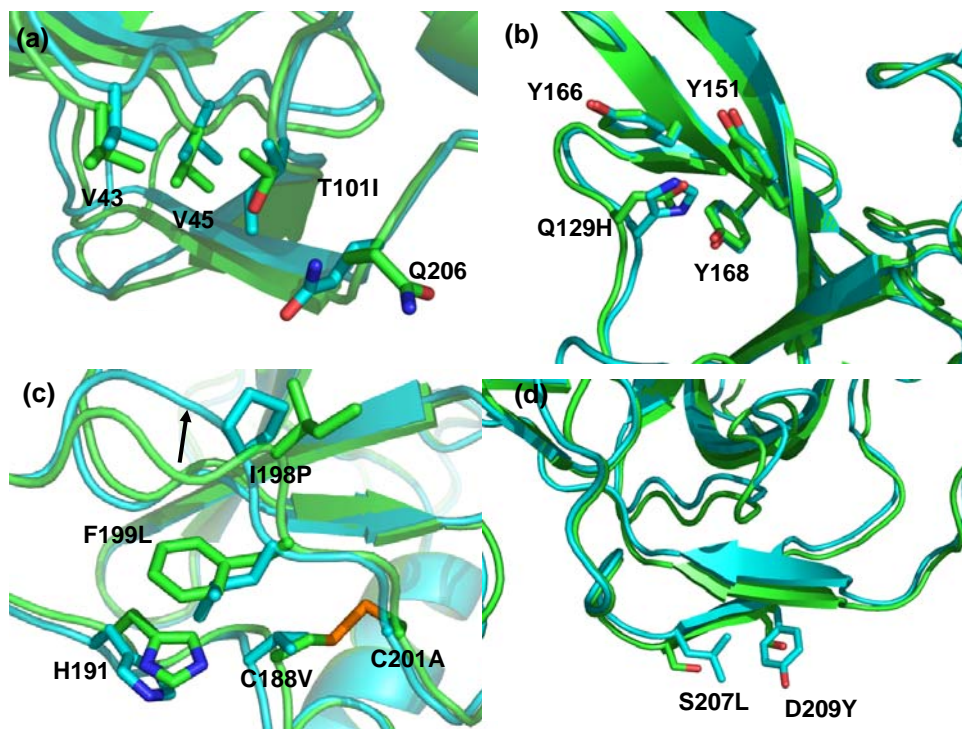


Abbildung 3.29: Ausschnitte aus den überlagerten Kristallstrukturen von Wildtyp-G3P (grün) und stabilisiertem OSS-G3P* (türkis). (a) Bereich der Mutation T101I, (b) Bereich Mutation Q129H, (c) Bereich der Mutationen L198P, F199L, C188V und C201A. Der Pfeil zeigt die Konformationsänderung des Loops zwischen den Resten S192 und F199. (d) Bereich der Mutationen S207L und D209Y. Die mutierten Reste sind im Stäbchenmodell dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific, 2005) nach den Kristallstrukturdaten für Wildtyp-G3P (Lubkowski *et al.*, 1998, *pdb-file* 1G3P) und dem stabilisierten OSS-G3P* (R. Jakob, Universität Bayreuth) erstellt.

Position 138

Die Mutation N138G stabilisiert das disulfidfreie G3P* um 5,9 °C (Tabelle 3.7, Variante 32). Die Φ - und Ψ -Winkel für Asn138 im Wildtyp-Protein liegen im unerlaubten Bereich ($\Phi = +67^\circ$, $\Psi = +10^\circ$), so daß sich die Mutation zu Glycin durch die für diesen Rest günstige Rückgratkonformation erklären läßt. Gly138 ist in einer Loop-Region zwischen den β -

Strängen 8 und 9 an der Domänengrenzfläche lokalisiert. Die benachbarten Aminosäuren Q137 und N139 sind durch viele Wechselwirkungen fixiert, die eventuell einen positiven Φ -Winkel an Position 138 erfordern. Diese Spannung im Peptidrückgrat des Wildtyp-Proteins wird durch N138G relaxiert. Im Wildtyp-G3P interagiert Asn138 mit Glu50. In der stabilisierten disulfidfreien G3P*-Variante ändert Glu50 seine Position, da dieser Rest mit Ile46 kollidieren würde. Die Mutation N138G ist damit auch mit den sterischen Änderungen und Behinderungen durch den Disulfidbrückenersatz zu erklären (Abbildung 3.27 e).

Position 198

Die Mutation L198P ist eine der beiden Mutationen, in denen sich das G3P der Phagen M13 und fd unterscheiden und kommt somit auch natürlicherweise vor. In der für den Vergleich verwendeten G3P-Kristallstruktur (*pdb-file* 1G3P) ist an Position 198 ein Isoleucin in die Elektronendichte eingepaßt. Pro198 wurde in verschiedenen Bibliotheken wiederholt als stabilisierende Mutation identifiziert. An Position 198 wurden neben Prolin auch Valin und Isoleucin selektiert, wobei der Ersatz zu Prolin am besten ist (Tabelle 3.7). Pro198 stabilisiert 0SS-G3P* um 5,3 °C, in Gegenwart von Trp29 ist der stabilisierende Beitrag nahezu gleich groß ($\Delta T_m = 5,6$ °C). Die Mutationen R29W und L198P beeinflussen sich nicht, die stabilisierenden Effekte sind additiv. Kombination von L198P mit den Mutationen R29W, N39K und T56I führt zu einer Stabilisierung der N2-Domäne um 4,3 °C. Hier wird nochmals der Einfluß der stabilisierenden Mutationen in N1 auf die Domäneninteraktionen deutlich. Die Stabilität der N1-Domäne ist etwas höher in Gegenwart der Mutation in N2 ($\Delta T_m = 1,3$ °C). Position 198 hat keinen Kontakt zur N1-Domäne, sondern befindet sich in einem Loop-Bereich, der für die Bindung des F-Pilus verantwortlich ist. Die Rückgratwinkel ($\Phi = -100^\circ$, $\Psi = +92^\circ$) im Wildtyp-Protein sind für Prolin ungünstig. Im disulfidfreien stabilisierten G3P* ändert sich das Rückgrat ($\Phi = -98^\circ$, $\Psi = +142^\circ$). Durch die Mutation zum Prolin ändert sich die Konformation des Loops zwischen den Resten S192 und F199. Dies wurde bereits von Holliger *et al.* (1999) bei der Analyse der Unterschiede zwischen M13- und fd-G3P beobachtet und ist in Abbildung 3.29 c (siehe Pfeil) erkennbar.

Position 199

Der Ersatz der aromatischen Aminosäure Phenylalanin zur aliphatischen Aminosäure Leucin an Position 199 hat eine Stabilisierung des Proteins um 3,5 °C zur Folge (Tabelle 3.7, Abbildung 3.14, Variante 35). Die Kombination dieser 0SS-G3P*-Variante mit den Mutationen R29W und N39K in der N1-Domäne führt zu einem zweiphasigen Übergang in der thermischen Entfaltung. Die N2-Domäne ist in diesem Fall um 3,2 °C stabilisiert. Dies zeigt, daß in der Einzelvariante die Gesamtstabilität durch diese Mutation erhöht wird, da N1 zu instabil ist, um separat entfalten zu können. Leu199 ist am Anfang des β -Strangs 12 lokalisiert. Es befindet sich in unmittelbarer Nähe zu Val188 (Abstand 4,3 Å), dem Cystein-Ersatz an dieser Position. Phe199 interagiert im Wildtyp-Protein mit der Disulfidbrücke

C188-C201 (Bhattacharyya *et al.*, 2004). Diese Wechselwirkungen werden in der disulfidfreien G3P*-Variante zerstört. Durch die Zugänglichkeit dieser Position könnte ein Leucin (25,2 % lösungsmittelzugängliche Oberfläche) günstiger als das hydrophobe Phenylalanin (8,4 % zugängliche Oberfläche) sein. Durch die Mutation zum Leu199 klappt His191 nach außen.

Positionen 207 und 209

Durch die Mutation des Serins an Position 207 zum Leucin wird das OSS-G3P* um 2,8 °C stabilisiert (Tabelle 3.7). Leu207 befindet sich in der Gelenk-Subdomäne der N2-Domäne am Anfang des β -Strangs 13. Leu207 ist Tyr209 nahe (Abstand: 4,4 Å), einer stabilisierenden Mutation aus der ersten Zufallsmutagenese des Wildtyp-G3P (D209Y) (Martin und Schmid, 2003b). Außer den zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen dieser Reste findet sich kein struktureller Hinweis für den stabilisierenden Effekt. Beide Reste sind oberflächenexponiert, und an Position 207 sollte an sich eine polare Aminosäure günstiger sein.

3.2.9 Strukturelle Analyse der Disulfidbrückensubstitutionen

Der Ersatz der Disulfidbrücke C7-C36 kann strukturell nicht analysiert werden, da die Kristallstruktur der disulfidfreien Variante in diesem Bereich nicht definiert ist. Dies läßt eine hohe Flexibilität der N-terminalen neun Aminosäuren vermuten. Im Wildtyp-Protein verbindet diese Disulfidbrücke die N-terminale Helix mit dem globulären Teil von N1. Da diese Verbindung fehlt, kann die N-terminale Helix nicht aufgelöst werden. Der Cysteinersatz wurde bereits in 3.1.5 erläutert.

Die Disulfidbrücke C46-C53 ist in der Nähe der Domänengrenzfläche und deshalb in dem Bereich des Proteins lokalisiert, an dem bei OSS-G3P* die meisten Änderungen stattfinden. In der Struktur des Wildtyp-Proteins ist die Disulfidbrücke C46-C53 von einigen aromatischen Resten umgeben (Trp57, Tyr100, Tyr102), die mit dem Cystin interagieren. In der disulfidfreien Variante ändert Glu50 seine Position wegen der Kollision mit dem Cys-Ersatz Ile46. Der Hohlraum über der Disulfidbrücke wird durch Trp29 geschlossen. Wie bereits im Zusammenhang mit der Mutation R29W erläutert, hat der enge Kontakt von W29 mit Ile46 / Val53 einen zusätzlichen stabilisierenden Effekt. Der C^β - C^β -Abstand des Ile / Val-Ersatzes ist mit 7,2 Å größer als für das Cystin (4,1 Å).

Die Disulfidbrücke C188-C201 im Wildtyp-Protein ist in der Nähe von Phe185 und Phe134, wodurch zusätzliche Interaktionen mit der Disulfidbrücke zur Stabilisierung führen (Bhattacharyya *et al.*, 2004). Bei Betrachtung der Rückgratwinkel Φ und Ψ fällt für Position 188 eine für Valin ungünstige Konformation auf (Pos.188: $\Phi = -134^\circ$, $\Psi = -14^\circ$ im disulfidfreien Protein). Der Disulfidbrückenersatz Val188 / Ala201 wurde bereits in 3.1.5 erläutert. Der Vergleich der C^β - C^β -Abstände der Cysteinreste im Wildtyp-Protein (3,9 Å) mit dem Ersatz Val / Ala (4,7 Å) zeigt, daß diese Kombination eine günstige räumliche Anordnung für die Substitution der Disulfidbrücke besitzt.

Eine Betrachtung der B-Faktoren zeigt nur im Bereich des Loops zwischen den Resten 155 und 163 hohe Werte, für den Großteil der Aminosäuren sind die B-Faktoren sehr niedrig. Die Dynamik einzelner Aminosäuren ist damit sehr eingeschränkt.

3.2.10 *Fazit aus der strukturbasierten Analyse der Stabilitätsdaten*

Die strukturelle Analyse der Mutationen im stabilisierten disulfidfreien G3P* ermöglicht im Zusammenhang mit den thermodynamischen Stabilitätsdaten eine erste Abschätzung der molekularen Basis für die beobachteten Stabilitätsbeiträge durch die einzelnen selektierten Aminosäuren. Besonders im Bereich der Domänengrenzfläche gibt es mehrere Faktoren, welche die Stabilität beeinflussen können. Durch die Mutation R29W in Kombination mit der Disulfidbrückensubstitution Ile46 / Val53 wird die N1-Domäne stabilisiert, die ungünstige Salzbrücke Arg29-Glu50 eliminiert und die Domäneninteraktionen verbessert. Da die Kristallstruktur als eine Momentaufnahme nur bedingt aussagekräftig ist, muß hier die Analyse weiterer Kombinationsvarianten hinzugezogen werden. Im Falle der Mutationen R29W und N39K lassen die Stabilitätsdaten für Varianten mit identischer N2-Domäne darauf schließen, daß keine verbesserte Domänenassoziation vorliegt. Für diese Varianten kompensieren sich die Effekte der Mutation R29W und der Disulfidbrückensubstitution C46I / C53V. Insgesamt treten bei den Mutationen im G3P* verschiedene Prinzipien der Stabilisierung in Erscheinung. Im Bereich der Domänengrenzfläche werden ungünstige ionische Wechselwirkungen im Proteininneren eliminiert, insbesondere durch die Substitution des vergrabenen Arg29 durch Trp. An der Proteinoberfläche (N39K) sorgen zusätzliche ionische Wechselwirkungen für eine Stabilitätserhöhung, eine verbesserte Packung hydrophober Reste (Q129H, T13I, G55A, T56I) sorgt für die Optimierung im Proteininneren und ungünstige Rückgratkonformationen (Position 15, 188) werden durch Mutationen zu energetisch an sich ungünstigen, aber flexibleren Glycinresten abgemildert. Das enorme Potential der stabilisierenden *second-site*-Mutationen wird deutlich, wenn man die stabilisierte disulfidfreie Variante mit dem disulfidverbrückten Wildtyp-Protein vergleicht. Der sehr große Verlust an Stabilität durch die Eliminierung von drei Disulfidbrücken wird durch die *second-site*-Mutationen deutlich überkompensiert. Die Untersuchung der stabilisierenden Effekte macht ferner die Komplexität der beteiligten Wechselwirkungen deutlich. Es ist klar, daß sie durch rein strukturbasiertes rationales Design nicht identifiziert werden können.

3.3 Charakterisierung der stabilisierenden Mutationen im disulfidverbrückten G3P*

Um aufzuklären, ob die selektierten *second-site*-Mutationen im G3P* mit intakten Disulfidbrücken ebenfalls stabilisieren, wurden die drei Disulfidbrücken in das stabilisierte OSS-G3P* wieder eingeführt (G3P mit 14 *second-site*-Mutationen). Abbildung 3.30 zeigt die Struktur des Wildtyp-G3P mit allen *second-site*-Mutationen. Diese Variante wurde durch Denaturierungsmittel-induzierte und durch thermische Entfaltung charakterisiert.

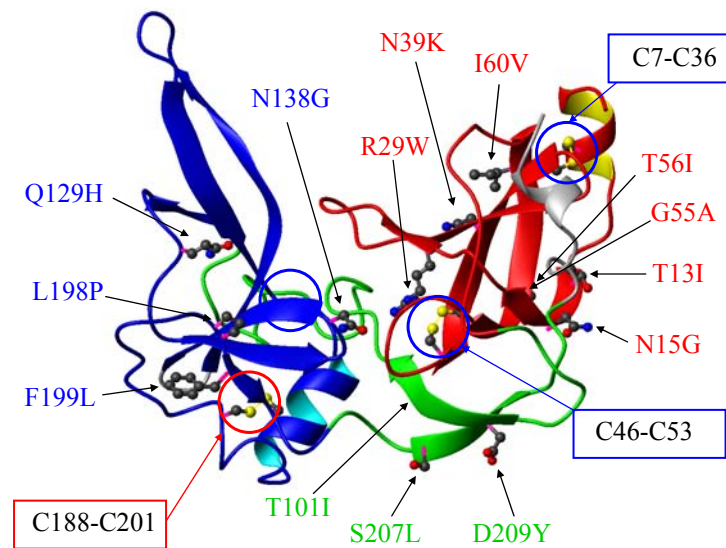


Abbildung 3.30: Tertiärstruktur des G3P* N1N2-Fragments mit allen selektierten stabilisierenden Mutationen, die in der Kombinationsvariante enthalten sind (Kristallstrukturdaten von Holliger *et al.*, 1999, *pdb-File 2 G3P*). Domäne N1 ist in rot dargestellt, Domäne N2 in blau und die Gelenk-Subdomäne von N2 in grün. Die Seitenketten der stabilisierenden Mutationen und der Cysteine sind im *ball-and-stick*-Modell dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm MolMol (Koradi *et al.*, 1996) erstellt.

3.3.1 GdmCl-induzierte Entfaltung

Zur Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltung wurde zunächst GdmCl verwendet. Fluoreszenzspektren bei 0-6 M GdmCl sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Auch im disulfidverbrückten stabilisierten G3P* reflektiert die Änderung der Tyrosinfluoreszenz die Entfaltung der N2-Domäne und die Änderung der Tryptophanfluoreszenz im wesentlichen die Entfaltung der N1-Domäne. Die Fluoreszenzspektren des disulfidverbrückten stabilisierten G3P* nach Anregung bei 280 nm (Abbildung 3.31 a) zeigen eine Fluoreszenzzunahme im Bereich der Tyrosinfluoreszenz bei 305 nm und eine Abnahme der Tryptophanfluoreszenz bei 340 nm. Nach Anregung bei 295 nm ist im Fluoreszenzspektrum (Abbildung 3.31 b) keine signifikante Änderung erkennbar. Dies läßt darauf schließen, daß die N1-Domäne so stark stabilisiert ist, daß sie in 6 M GdmCl noch gefaltet vorliegt.

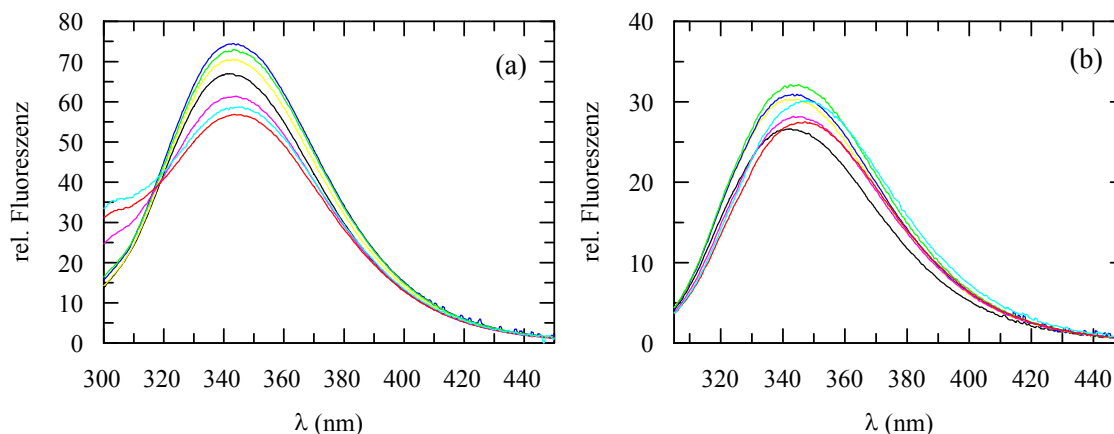


Abbildung 3.31: Fluoreszenzspektren von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen in 0-6 M GdmCl, (a) Anregungswellenlänge 280 nm, (b) Anregungswellenlänge 295 nm. Die Spektren wurden mit 1 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 35 °C und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Dargestellt sind die Spektren bei 0 M (–), 1 M (–), 2 M (–), 3 M (–), 4 M (–), 5 M (–) und 6 M (–) GdmCl.

Der GdmCl-induzierte Entfaltungsübergang wurde bei verschiedenen Wellenlängen anhand der Fluoreszenzänderung beobachtet. Abbildung 3.32 zeigt die relative Fluoreszenz in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Dabei wurde die Tyrosinfluoreszenz (Anregung: 280 nm, Emission: 305 nm) beobachtet, außerdem Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz (Anregung: 280 nm, Emission: 340 nm) und selektiv nur die Tryptophanfluoreszenz (Anregung: 295 nm, Emission: 360 nm). Für alle drei Wellenlängen ist nur ein Übergang sichtbar, welcher der N2-Domäne entspricht. Der Übergangsmittelpunkt liegt bei 3,2 M GdmCl.

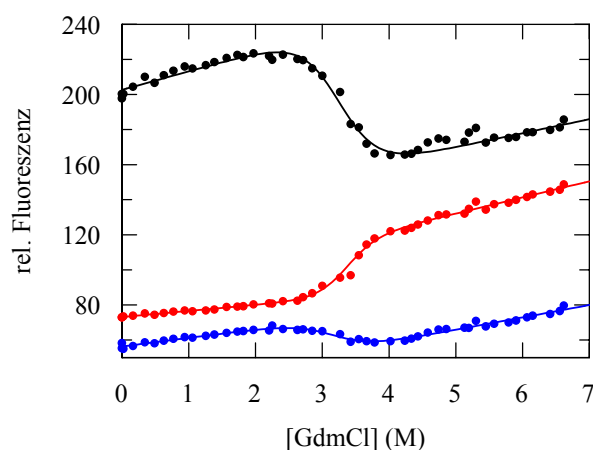


Abbildung 3.32: GdmCl-induzierter Entfaltungsübergang von 3SS-G3P* mit allen 14 stabilisierenden Mutationen. Der Übergang wurde mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 35 °C anhand der Fluoreszenz bei 305 nm (—) und 340 nm (—) nach Anregung bei 280 nm und bei 360 nm (—) nach Anregung bei 295 nm gemessen.

Die zugehörigen Stabilitätsdaten sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Die Daten für die drei verschiedenen Wellenlängen stimmen überein und lassen vermuten, daß die N1-Domäne tatsächlich bei 6 M GdmCl und 35 °C noch gefaltet vorliegt. Da in N2 nur ein Tryptophan vorhanden ist (W181), ist die Änderung der Tryptophanfluoreszenz sehr klein, und die entsprechenden Daten sind ungenau.

Tabelle 3.12: Stabilitätsdaten der GdmCl-induzierten Entfaltung des 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen.

Fluoreszenzsonde	Entfaltung von N2		
	m	$\Delta G_D^{35^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)
ex 280 nm/em 305 nm	11,4	38,2	3,4
ex 280 nm/em 340 nm	8,9	28,9	3,2
ex 295 nm/em 360 nm	8,8	28,1	3,2

Angegeben sind der Kooperativitätsparameter m in $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$, die freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit des Denaturierungsmittels $\Delta G_D^{35^\circ\text{C}}$ in kJ/mol und die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_{1/2}$ in M. Die Daten beziehen sich auf die Entfaltung des N1N2-Fragments bei verschiedenen Wellenlängen für Anregung (ex) und Emission (em). Die Daten wurden gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet.

3.3.2 GdmSCN-induzierte Entfaltung

Um auch die N1-Domäne zu entfalten, wurde das stabilisierte 3SS-G3P* mit dem stärkeren Denaturierungsmittel GdmSCN denaturiert. Abbildung 3.33 zeigt die Fluoreszenzspektren in 0-5 M GdmSCN nach Anregung bei 280 nm und bei 295 nm.

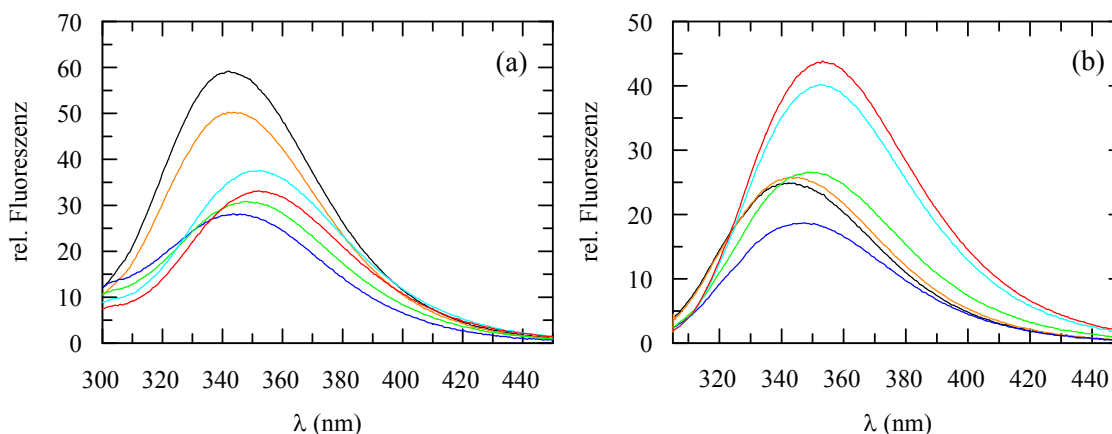


Abbildung 3.33: Fluoreszenzspektren von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen in 0-6 M GdmSCN, (a) Anregungswellenlänge 280 nm, (b) Anregungswellenlänge 295 nm. Die Spektren wurden mit 1 μM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 35 °C gemessen. Dargestellt sind die Spektren bei 0 M (–), 1 M (–), 2 M (–), 3 M (–), 4 M (–), 5 M (–) GdmSCN.

Die Fluoreszenzspektren zeigen in diesem Fall sowohl nach Anregung bei 280 nm als auch nach Anregung bei 295 nm starke GdmSCN-induzierte Änderungen. Dabei können zwei gegenläufige Effekte beobachtet werden. Die Spektren sind durch eine Fluoreszenzabnahme zwischen 0 und 2 M GdmSCN gekennzeichnet, zwischen 2 und 5 M GdmSCN nimmt die Fluoreszenz dann wieder zu.

Der GdmSCN-induzierte Entfaltungsübergang ist bei allen Wellenlängen zweiphasig (Abbildung 3.34 a). Im ersten Übergang zwischen 1,0 M und 1,6 M GdmSCN nimmt die Fluoreszenz ab (Domänendissoziation und Entfaltung von N2), und im zweiten Übergang zwischen 2,5 M und 3,7 M GdmSCN (Entfaltung der N1-Domäne) wieder zu. Im Fall des stabilisierten 3SS-G3P* ändern sich Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz bei der Entfaltung beider Domänen, N2 und N1. Um die beiden Entfaltungsreaktionen den Domänen zuordnen zu können, wurde die isolierte N1-Domäne des Proteins überexprimiert und entfaltet

(Abbildung 3.34 b). Ein Vergleich mit dem Übergang des N1N2-Fragments bestätigt, daß tatsächlich die zweite Reaktion der Entfaltung der N1-Domäne zuzuordnen ist. Der Übergang der isolierten N1-Domäne erfolgt zwischen 2,5 M und 3,7 M GdmSCN mit einem Mittelpunkt von etwa 3,1 M GdmSCN. Die Auswertung der Daten aus der GdmSCN-Entfaltung ist komplex. SCN⁻-Ionen wirken entfaltend, aber sie löschen auch die Emission exponierter Fluorophore im entfalteten Protein. Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von nativem und entfaltetem Protein von der GdmSCN-Konzentration ist damit komplexer als beim Denaturierungsmittel GdmCl. Dies erschwert die Auswertung gemäß dem Zweizustandsmodell bzw. dem Dreizustandsmodell unter den bisherigen Annahmen. Die Entfaltungsübergänge können hier nur eingeschränkt analysiert und verglichen werden. Die Daten aus der Zweizustandsanalyse in Tabelle 3.13 sind nur als Anhaltspunkt zu bewerten.

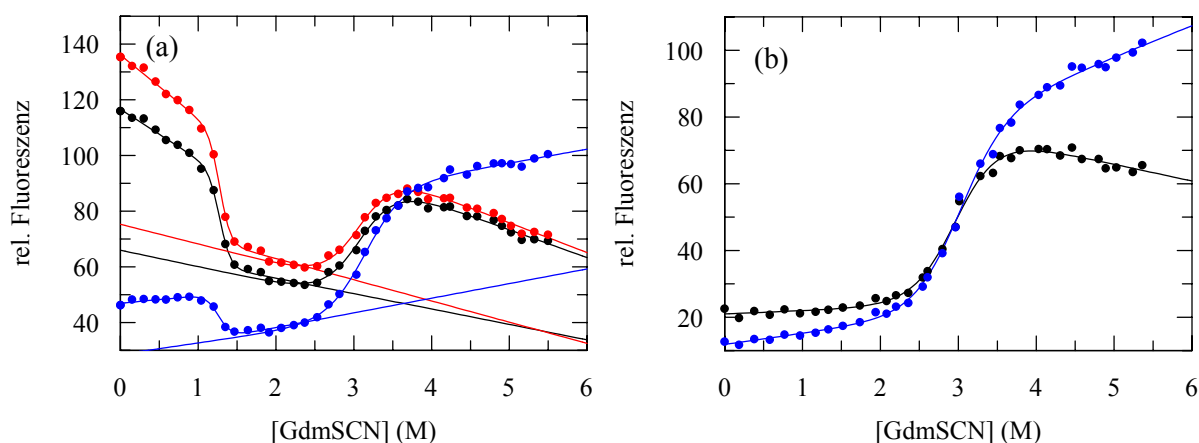


Abbildung 3.34: GdmSCN-induzierter Entfaltungsübergang von 3SS-G3P* mit allen 14 stabilisierenden Mutationen. Der Übergang wurde mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 35 °C anhand der Fluoreszenz bei 350 nm (—) und 360 nm (—) nach Anregung bei 280 nm und bei 360 nm (—) nach Anregung bei 295 nm gemessen. (a) GdmSCN-induzierte Entfaltung des N1N2-Fragments, (b) GdmSCN-induzierte Entfaltung der isolierten N1-Domäne. Der Angleich an die experimentellen Daten erfolgte gemäß einem Zweizustandsmodell für die getrennten Übergänge unter der für GdmSCN vereinfachenden Annahme der linearen Abhängigkeit von der Denaturierungsmittel-Konzentration.

Die enorme Stabilität des 3SS-G3P* mit den 14 *second-site*-Mutationen wird ferner dadurch deutlich, daß 3 M des sehr starken Denaturierungsmittel GdmSCN nötig sind, um die N1-Domäne bei 35 °C zu entfalten. Die *m*-Werte der Entfaltung der N1-Domäne im N1N2-Fragment und in der isolierten N1-Domäne stimmen sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den *m*-Werten der N1-Domänen des Wildtyp-G3P in der GdmCl-induzierten Entfaltung (Tabelle 3.4) sehr gut überein. Die Kooperativitäten aus der Entfaltung der N2-Domäne sind hingegen deutlich größer als bei Denaturierung mit GdmCl.

Tabelle 3.13: Stabilitätsdaten der GdmSCN-induzierten Entfaltung des 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen.

Fluoreszenz-sonde	Entfaltung von N2			Entfaltung von N1		
	<i>m</i>	$\Delta G_D^{35^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmSCN}]_{1/2}$ (M)	<i>m</i>	$\Delta G_D^{35^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmSCN}]_{1/2}$ (M)
ex 280/em 305 nm	30,8	40,4	1,3			
ex 280/em 350 nm	38,1	48,8	1,3	11,2	34,6	3,1
ex 280/em 360 nm	37,4	48,0	1,3	11,0	33,8	3,1
ex 295/em 360 nm	31,9	40,4	1,3	10,3	32,4	3,1
Fluoreszenz-sonde	isolierte N1-Domäne					
	<i>m</i>	$\Delta G_D^{35^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	$[\text{GdmSCN}]_{1/2}$ (M)			
ex 280/em 320 nm	8,9	28,3	3,0			
ex 280/em 360 nm	9,5	28,3	3,0			
ex 295/em 360 nm	8,6	25,7	3,0			

Angegeben sind der Kooperativitätsparameter m in $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$, die freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit des Denaturierungsmittels $\Delta G_D^{35^\circ\text{C}}$ in kJ/mol und die GdmSCN-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmSCN}]_{1/2}$ in M. Die Daten beziehen sich auf die Entfaltung des N1N2-Fragments bei verschiedenen Wellenlängen für Anregung (ex) und Emission (em). Die Daten wurden gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet.

3.3.3 Thermische Entfaltung des stabilisierten disulfidverbrückten G3P*

Die hohe Stabilität der N1-Domäne in 3SS-G3P* mit den 14 *second-site*-Mutationen wurde außerdem durch thermische Denaturierung analysiert. Dazu wurde das N1N2-Fragment in 6 M GdmCl aufgenommen und dann erhitzt. Unter diesen Bedingungen liegt die N2-Domäne bereits entfaltet vor. N1 sollte gemäß den Ergebnissen der GdmCl-induzierten Entfaltung (3.3.1) in 6 M GdmCl bei 35 °C noch gefaltet vorliegen, was durch Fern-UV-CD-Spektren in Gegenwart von 6 M GdmCl bestätigt werden konnte. Die thermische Entfaltung in 6 M GdmCl, gemessen anhand der Änderung des CD-Signals bei 230 nm, ist in Abbildung 3.35 a dargestellt.

Der Schmelzpunkt der N1-Domäne in 6 M GdmCl beträgt 68,7 °C. Hier wird nochmals die extreme Stabilisierung des Proteins durch die 14 *second-site*-Mutationen deutlich. Im Vergleich zum disulfidverbrückten Referenzprotein G3P* (G3P mit vier stabilisierenden Mutationen) aus der Zufallsmutagenese des Wildtyp-Proteins, welches den Ausgangspunkt für die Substitution der Disulfidbrücken darstellte (Martin und Schmid, 2003b), liegt in diesem Protein durch die 10 zusätzlichen Mutationen eine Stabilisierung um 6 M GdmCl vor. Die N1-Domäne des G3P* besitzt einen T_m von 68,6 °C in Abwesenheit von Denaturierungsmittel. Die niedrige Kooperativität des Entfaltungsübergangs von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen ist durch die hohe Konzentration an GdmCl zu erklären. Die Bindung von GdmCl ans Protein ist ein exothermer Vorgang, welcher dem endothermen Vorgang der Entfaltung entgegenwirkt. Die apparente Enthalpie ΔH_D ist also durch den Effekt des GdmCl verringert.

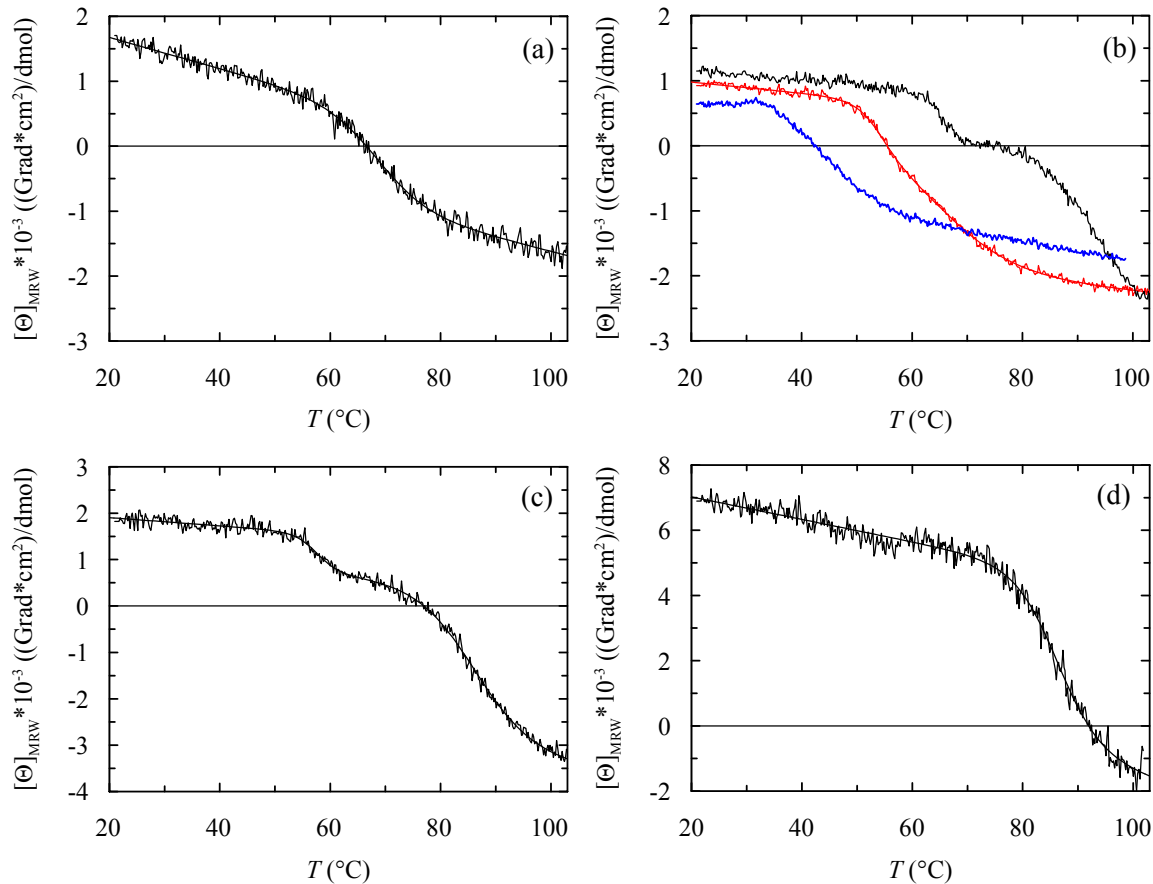


Abbildung 3.35: Thermische Entfaltung von 3SS-G3P* mit allen 14 stabilisierenden Mutationen. (a) Entfaltung des N1N2-Fragments in Gegenwart von 6 M GdmCl. (b) Entfaltung von G3P-Wildtyp (—), 0SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen (—) und 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen (—) in Gegenwart von 1,5 M GdmCl. (c) Entfaltung des N1N2-Fragments in Gegenwart von 3 M GdmCl. (d) Entfaltung der isolierten N1-Domäne in Gegenwart von 3 M GdmCl. Die Übergänge wurden mit 4 µM (bzw. 1 µM in c und d) Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm und einer Heizrate von 60 K/h gemessen. Angegeben ist die Änderung des CD-Signals bei 230 nm.

Abbildung 3.35 b vergleicht die thermischen Entfaltungsübergänge von G3P-Wildtyp, 0SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen und 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen in Gegenwart von 1,5 M GdmCl. Für alle Übergänge ist eine zweiphasige Entfaltung erkennbar, wobei die beiden Übergänge für 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen am deutlichsten getrennt sind. Für diese Variante ist in Gegenwart von 1,5 M GdmCl keine vollständige Entfaltung bis 104 °C möglich. Der Vergleich der Varianten zeigt trotzdem deutlich die starke Stabilisierung durch die *second-site*-Mutationen. Die Stabilität von N1 im N1N2-Fragment und der isolierten N1-Domäne in Gegenwart von 3 M GdmCl (Abbildung 3.35 c/d) liegt bei 86 °C bzw. 88 °C. Der zweite Übergang ist eindeutig der N1-Domäne zuzuordnen. Die Analyse der Stabilität der N1-Domäne ist dabei fehlerbehaftet, da die Basislinie des denaturierten Proteins nicht mehr erreicht wird.

Die thermische Entfaltung der stabilisierten Variante in Gegenwart und Abwesenheit der Disulfidbrücken wurde außerdem mittels Absorption untersucht (Abbildung 3.36).

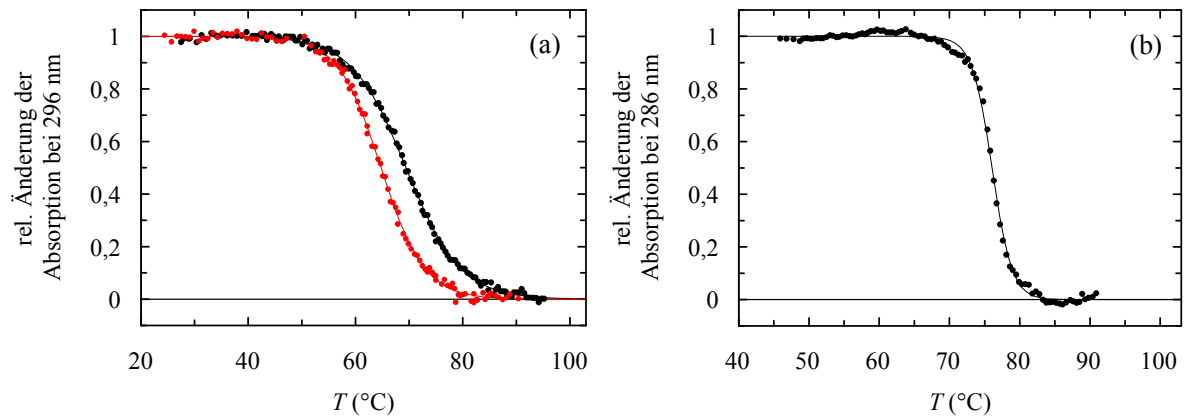


Abbildung 3.36: Thermische Entfaltung von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen. (a) Thermische Entfaltung der isolierten 2SS-G3P* N1-Domäne mit allen stabilisierenden Mutationen in Gegenwart von 6 M GdmCl verfolgt mittels Absorption bei 296 nm (●) im Vergleich zur thermischen Entfaltung der N1-Domäne des Referenzproteins 3SS-G3P* in Abwesenheit von GdmCl (●). (b) Thermische Entfaltung des N1N2-Fragments beobachtet mittels Absorption bei 286 nm. Die Übergänge wurden mit 10 µM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Die durchgezogenen Linien zeigen Angleiche an die Daten gemäß einem Zweizustandsmodell. Die zugehörigen Stabilitätsdaten sind in Tabelle 3.14 aufgeführt.

Die Änderung der Absorption bei 296 nm bei der thermischen Entfaltung der isolierten N1-Domäne in 6 M GdmCl (Abbildung 3.36 a) zeigt den gleichen Verlauf wie die Änderung des CD bei 230 nm bei der thermischen Entfaltung des N1N2-Fragments (Abbildung 3.35 a). Dies bestätigt die extrem hohe Stabilität dieser N1-Domäne. Im Vergleich zur N1-Domäne des Ausgangsproteins 3SS-G3P* ist die N1-Domäne mit den stabilisierenden Mutationen aus der Selektion um 6 M GdmCl stabilisiert, denn der Schmelzpunkt der N1-Domäne von 3SS-G3P* ($T_m = 64,8\text{ °C}$) in Abwesenheit von GdmCl ist niedriger als der Schmelzpunkt der N1-Domäne des stabilisierten 3SS-G3P* ($T_m = 69,4\text{ °C}$). Um den Übergang der N2-Domäne zu validieren, wurden DSC-Messungen durchgeführt. Die thermischen Entfaltungen bei 0 M und 3 M GdmCl wurde mittels DSC gemessen und sind in Abbildung 3.37 dargestellt.

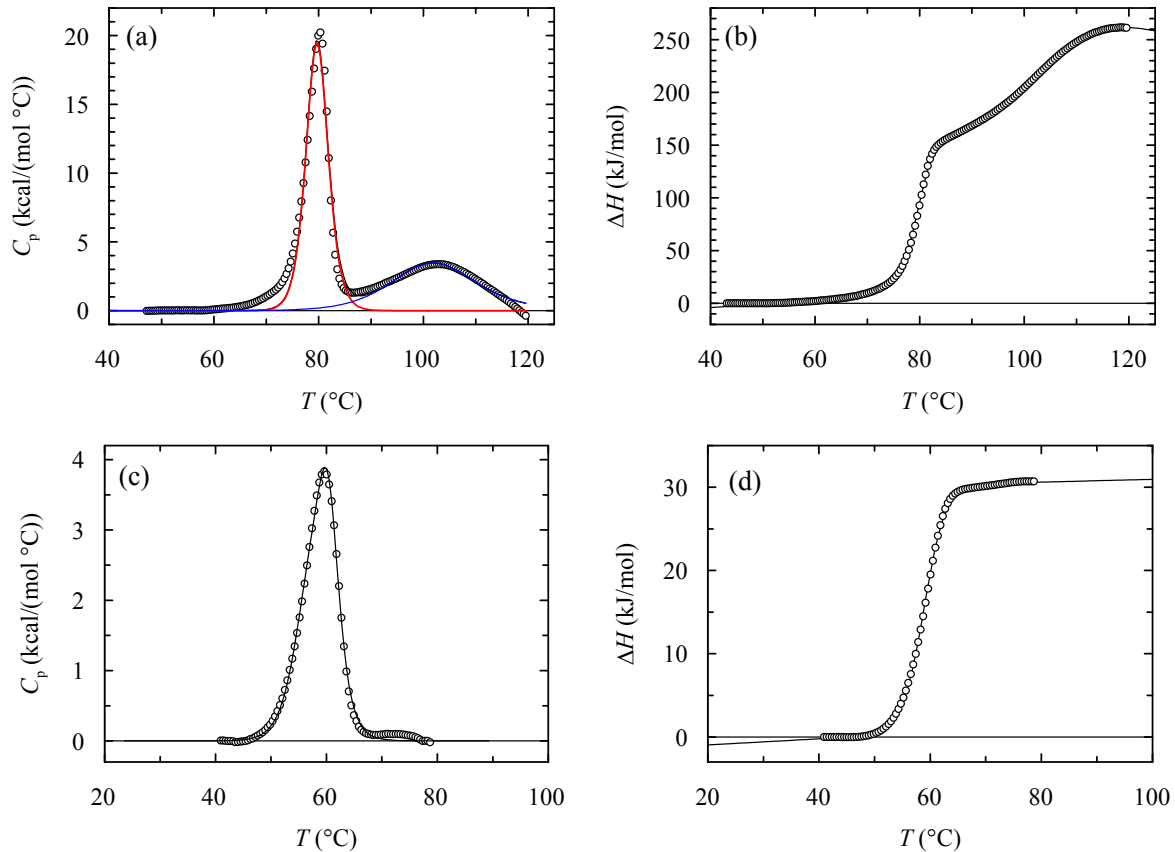


Abbildung 3.37: DSC von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen. (a) Änderung der Wärmekapazität bei thermischer Entfaltung in Abwesenheit von GdmCl. (b) Enthalpieänderung bei thermischer Entfaltung in Abwesenheit von GdmCl. (c) Thermische Entfaltung in Gegenwart von 3 M GdmCl. (d) Enthalpieänderung bei thermischer Entfaltung in Gegenwart von 3 M GdmCl. Die Messung wurde mit 25 μ M (in Abwesenheit von GdmCl) bzw. 65 μ M (in Gegenwart von 3 M GdmCl) des Proteins in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Heizrate von 90 K/h durchgeführt. In (a) und (c) gibt die durchgezogene Linie das Ergebnis der Levenberg-Marquardt-Analyse nach dem Nicht-Zweizustandsmodell wieder, und die rote und blaue Linie repräsentieren die Dekonvolution in zwei unabhängige Entfaltungsübergänge für die Domänen N1 und N2. Die durchgezogene Linie zeigt in (b) den Angleich an die Daten gemäß einem Dreizustandsmodell bzw. in (d) gemäß einem Zweizustandsmodell. Die zugehörigen thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.14 zusammengefaßt.

DSC ist vor allem für die Entfaltung der N2-Domäne eine sensitive Sonde, da die Enthalpieänderung bei Entfaltung aufgrund der Domänengröße (131 Aminosäuren) groß ist. Die Übergangsmittelpunkte für die beiden Domänen bei Entfaltung in 0 M GdmCl und in 3 M GdmCl entsprechen den Ergebnissen aus der thermischen Entfaltung beobachtet mittels Absorption und CD (Tabelle 3.14). In Gegenwart von 3 M GdmCl ist die Kooperativität des N1-Übergangs sehr niedrig, und die Übergänge der beiden Domänen sind nicht deutlich getrennt. N1 kann deshalb in Abbildung 3.37 c/d nicht analysiert werden. Im Rahmen der Genauigkeit der Auswertung stimmen auch die Enthalpien für N1 und N2 bei den verschiedenen Meßmethoden gut überein. Die Stabilitätsdaten für die thermische Entfaltung mittels Absorption, CD und DSC sind in Tabelle 3.14 aufgeführt. Sowohl die T_m -Werte als auch die Enthalpien stimmen für die verschiedenen Sonden gut überein.

Tabelle 3.14: Stabilitätsdaten der thermischen Entfaltung mittels CD, Absorption und DSC von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen.

3SS-G3P* mit allen stab. Mutationen	CD N2			Absorption N2		DSC N2	
[GdmCl] (M)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	ΔG_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)
0	76,2	778	40,6	76,1	712	79,5	620
1,5	65,1	606	16,7	-	-	-	-
3	57,5	457	3,4	-	-	57,4	472
6	-	-	-	-	-	-	-
[GdmCl] (M)	CD N1			Absorption N1		DSC N1	
	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	ΔG_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)
0	100,1	197	16,9	-	-	103,8	167
1,5	93,5	224	16,3	-	-	-	-
3	86,0	203	11,3	-	-	-	-
6	68,7	211	2,3	-	-	-	-
[GdmCl] (M)	CD isol. N1			Absorption isol. N1		DSC isol. N1	
	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	ΔG_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)
3	88,1	257	15,6	-	-	-	-
6	-	-	-	69,4	193	-	-

Für die verschiedenen Varianten sind Übergangsmittelpunkt (T_m in °C) und die Enthalpie der Entfaltung am Übergangsmittelpunkt ΔH_D in kJ/mol angegeben. Für die Daten aus den CD-Messungen ist für die N2-Domäne die freie Enthalpie der Entfaltung $\Delta G_D^{55^\circ\text{C}}$ bei 55 °C und für die N1-Domäne $\Delta G_D^{65^\circ\text{C}}$ bei 65 °C in kJ/mol angegeben.

3.3.4 Fazit aus der Stabilitätsanalyse von 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen

Die Untersuchung der thermodynamischen Stabilität der G3P-Variante mit 14 stabilisierenden Mutationen im disulfidverbrückten Hintergrund zeigt den enormen Beitrag der in der Selektion identifizierten Mutationen. Auch in Gegenwart der Disulfidbrücken haben die *second-site*-Mutationen einen großen stabilisierenden Effekt. Dies ist aufgrund der strukturellen Analysen erstaunlich, die auf eine Korrelation der Effekte von R29W, N138G und des Disulfidbrückenersatzes C46I / C53V schließen lassen. Das Wiedereinführen dieser Disulfidbrücke sollte strukturelle Änderungen im Bereich der Domänengrenzfläche nach sich ziehen. Die Stabilitätsanalyse zeigt jedoch, daß auch in Gegenwart dieser Disulfidbrücke die stabilisierenden Effekte von R29W und N138G erhalten bleiben. Dies ist nochmals ein Hinweis auf die Flexibilität der Gelenkregion des G3P, die unterschiedliche Orientierungen der Domänen zueinander ermöglicht. Aus der Analyse der Mutation R29W im 0SS- und 3SS-G3P* (Stöckl, 2005) kann man jedoch schließen, daß der stabilisierende Effekt der Mutation R29W im disulfidfreien Protein größer ist. Ob die Stabilitätsbeiträge der 14 Mutationen im disulfidverbrückten Protein additiv sind, bleibt unklar. Festzuhalten ist jedoch der generell vielversprechende Ansatz zur Stabilisierung disulfidhaltiger Proteine, eine Selektion stabilisierender Mutationen in Abwesenheit der Disulfidbrücken durchzuführen und diese dann auf das disulfidverbrückte Protein übertragen zu können. Ein solcher Ansatz wurde bereits erfolgreich für die Stabilisierung von RNase T1 angewendet (Sieber *et al.*, 1998).

3.4 Faltung des stabilisierten, disulfidfreien G3P

Die Untersuchung der Faltungskinetik des stabilisierten, disulfidfreien G3P* gibt Aufschluß darüber, inwieweit die stabilisierenden Mutationen den Faltungsmechanismus der beiden Domänen verändern. Für das stabilisierte, disulfidverbrückte G3P* wurde der Faltungsmechanismus von A. Martin analysiert (Martin und Schmid, 2003c). Im disulfidverbrückten G3P* erfolgt die Rückfaltung der beiden Domänen N1 und N2 mit sehr unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten. Während die Rückfaltung von N2 in zwei Phasen ($\tau = 7$ s und $\tau = 42$ s) verläuft, faltet die N1-Domäne 500mal schneller mit einer Zeitkonstante von 9,4 ms (Martin und Schmid, 2003c). Die Entfaltung beider Domänen im nativen Protein ist durch einen gemeinsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt limitiert, der Domänen dissoziationsreaktion.

3.4.1 Faltungskinetik der isolierten N1-Domäne

Zur Analyse des Faltungsmechanismus des disulfidfreien G3P* wurden zunächst die isolierten N1-Domänen der 0SS-G3P*-Varianten untersucht. Die Faltung dieser disulfidfreien Domänen wurde anhand der Tryptophanfluoreszenz beobachtet und im Vergleich zur disulfidverbrückten N1-Domäne (G3P* T13I) analysiert. Die aus den Zeitverläufen erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten λ wurden in einer sogenannten Chevron-Auftragung logarithmisch gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Dabei ergibt sich λ als Summe der Ent- und Rückfaltungsraten bei der entsprechenden Denaturierungsmittelkonzentration (Gl. 2.25). Am Übergangsmittelpunkt sind die Ent- und Rückfaltungsraten identisch, so daß dieser durch den Schnittpunkt der extrapolierten Ent- und Rückfaltungsraten bestimmt wird. Der kinetische m -Wert reflektiert die Denaturierungsmittelabhängigkeit der Faltungsraten. Die Denaturierungsmittelabhängigkeit der Entfaltungsraten von N1 ist sehr klein ($m = 1,04 \text{ M}^{-1}$ für G3P* T13I). Auch für die Rückfaltung ergibt sich ein ähnlich flacher Verlauf in der Chevron-Auftragung. Abbildung 3.39 zeigt die Faltungsraten der Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen der isolierten N1-Domänen der 0SS-G3P*-Varianten mit den Mutationen N15G / G55A / R29W / N39K bzw. N15G / R29W / N39K / G55A / T56I / I60V in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Dargestellt sind jeweils die Chevron-Auftragung der Faltungsraten, die zugehörigen Amplituden sowie die Start- und Endwerte der Faltungsreaktionen.

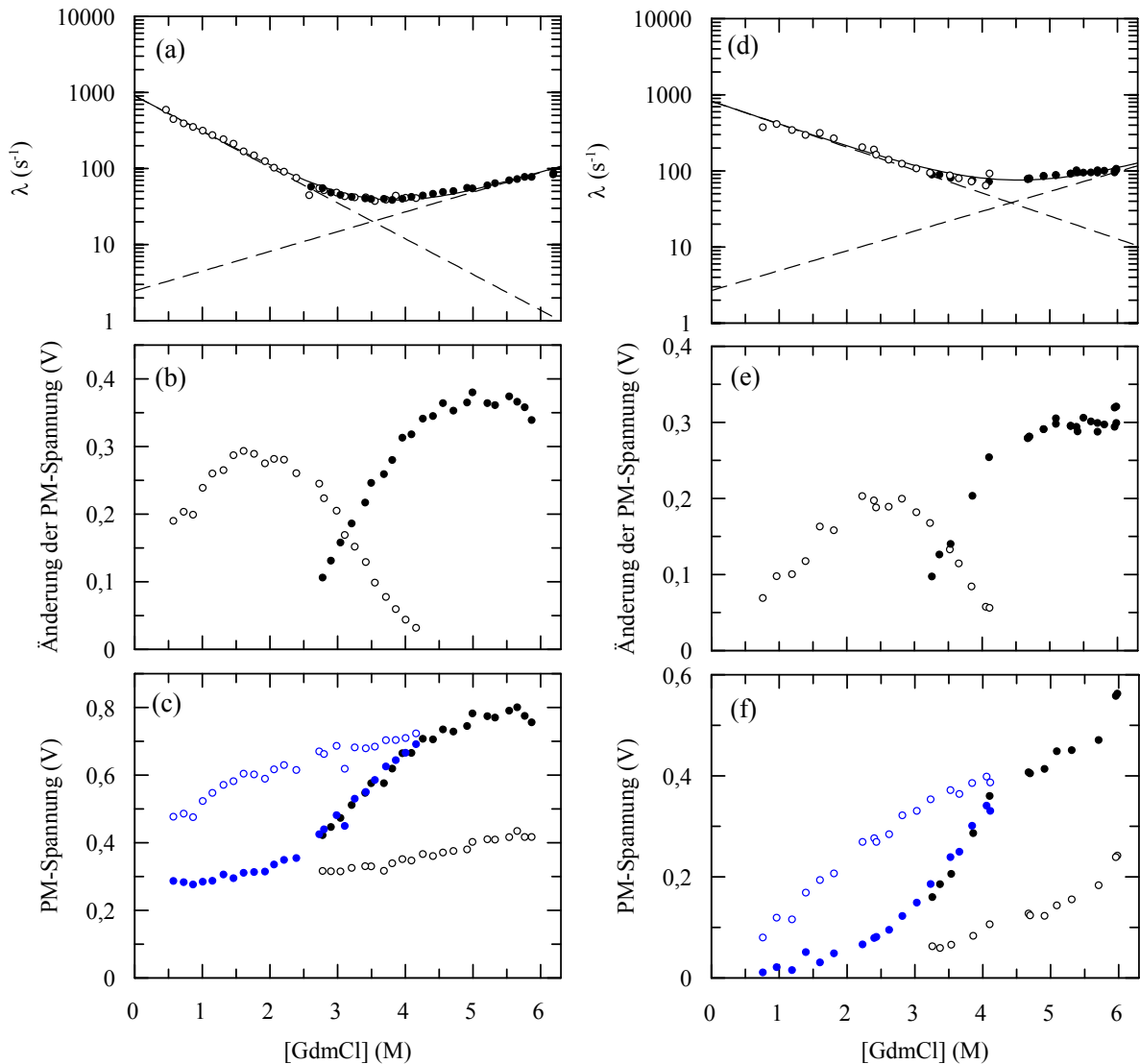


Abbildung 3.38: Faltungskinetik von OSS-G3P* N15G/G55A/R29W/N39K/F199L (a-c) und OSS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V/N138G/L198P/F199L/S207L (d-f). (a, d) Dargestellt sind die Chevron-Auftragung der apparenten Entfaltungs- (●) und Rückfaltungsraten (○). Die gestrichelten Linien in a und d geben extrapolierten Ent- und Rückfaltungsraten an, die durchgezogenen Linien sind Angleiche an die experimentellen Daten auf der Grundlage eines Zweizustandsmodells. (b, e) zeigen die Amplituden der Entfaltungskinetiken (●) und der Rückfaltungskinetiken (○) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration und (c, f) die Start- und Endwerte der Entfaltung (○, ●) und der Rückfaltung (○, ●) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Kinetiken wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C nach schneller Mischung in der *stopped-flow*-Apparatur gemessen. Es wurde die Tryptophanfluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm gemessen.

Abbildung 3.39 zeigt die Chevron-Auftragung aller OSS-G3P*-Varianten im Vergleich zum Referenzprotein 3SS-G3P* N1 T13I. Bei den Varianten OSS-G3P* N1 R29W / N39K und OSS-G3P* N1 R29W / N39K / G55A / I60V ist die Entfaltung um den Faktor fünf bis zehn beschleunigt, die Rückfaltung etwa um den Faktor vier. Bei den Varianten OSS-G3P* N1 N15G / G55A / R29W / N39K und N15G / R29W / N39K / G55A / T56I / I60V hingegen ist die Entfaltung im Vergleich zur disulfidverbrückten N1-Domäne wenig beeinflusst. Die Rückfaltung dieser Varianten ist auch bei diesen Varianten etwa um den Faktor vier beschleunigt.

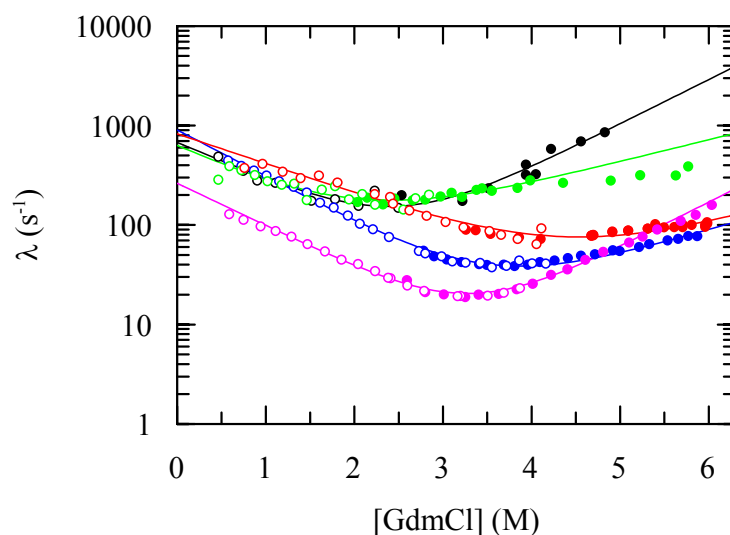


Abbildung 3.39: Chevron-Auftragung der N1-Domänen der verschiedenen 0SS-G3P*-Varianten im Vergleich zum disulfidverbrückten Referenzprotein 3SS-G3P* N1 T13I (●, ○). Dargestellt sind die Entfaltungsraten (gefüllte Symbole) und die Rückfaltungsraten (offene Symbole) der Varianten R29W/N39K (●, ○), R29W/N39K/G55A/I60V (●, ○), N15G/R29W/N39K/G55A (●, ○) und N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V (●, ○).

Aus der Chevron-Auftragung können durch eine Zweizustandsanalyse die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und der Rückfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel bestimmt werden (k_{NU} und k_{UN}). Der Quotient dieser Raten entspricht der Gleichgewichtskonstante, und aus dieser kann die thermodynamische Stabilität berechnet werden. Abbildung 3.39 zeigt, daß die N1-Domänen aller 0SS-G3P*-Varianten etwa gleich schnell falten, und zwar mit einer Geschwindigkeitskonstante von etwa 500 s^{-1} bei $0,5 \text{ M}$ GdmCl. Auch die GdmCl-Abhängigkeit der Faltungsraten ist bei allen 0SS-G3P* N1-Domänen etwa gleich. Im Vergleich zur N1-Domäne des disulfidverbrückten Referenzproteins 3SS-G3P* ist die Faltung aller disulfidfreien N1-Domänen etwa um den Faktor 4 schneller. Die beschleunigte Rückfaltung ist also unabhängig von der Stabilisierung der N1-Domäne, stattdessen ist der Verlust der Disulfidbrücken für die Faltungsreaktion günstig. Die N1-Domänen der 0SS-G3P*-Varianten unterscheiden sich jedoch stark in den Entfaltungsraten. Dies deutet darauf hin, daß die stabilisierenden Effekte erst nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Faltungsschritt auftreten und daher den nativen Zustand des Proteins stabilisieren. Eine verlangsamte Entfaltung der stabilsten 0SS-G3P*-Varianten bestätigt den Effekt der stabilisierenden Mutationen auf den nativen Zustand. Die kinetischen m -Werte geben Auskunft über die GdmCl-Abhängigkeit der Faltungsraten. α ist die anteilige Änderung des Rückfaltungs- m -Wertes bezogen auf die Gesamtänderung. Der α -Wert gibt daher Auskunft über die Nativähnlichkeit des Übergangszustands. Sowohl für das disulfidverbrückte G3P* als auch für die 0SS-G3P*-Varianten sind die Denaturierungsmittelabhängigkeiten von Ent- und Rückfaltungsraten im Betrag ähnlich, der Übergangszustand ist deshalb zu $\sim 50 \%$ nativ. Die stabilisierenden Mutationen ändern also die Energie des nativen Zustands und nicht den Weg dorthin. Dies ist die einfachste

Möglichkeit für die Stabilisierung eines Proteins. Die kinetischen Parameter für die einzelnen N1-Domänen sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tabelle 3.15: Kinetische Daten der verschiedenen 0SS-G3P* N1-Varianten im Vergleich zu 2SS-G3P* N1.

Nr.	G3P*-Varianten	k_{NU} (s ⁻¹)	k_{UN} (s ⁻¹)	m_{NU} (M ⁻¹)	m_{UN} (M ⁻¹)	α	[GdmCl] _{1/2} (M)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	$\Delta G_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
2	2SS G3P*	0,33	262	1,04	-0,98	0,49	3,3	5,01	16,6
19	0SS R29W/N39K	4,95	694	1,23	-0,94	0,43	2,3	5,38	12,3
20	0SS R29W/N39K/ G55A/I60V	33,6	598	0,51	-0,93	0,65	2,0	3,57	7,1
21	0SS N15G/R29W/ N39K/G55A	2,47	904	0,60	-1,08	0,64	3,5	4,16	14,6
23	0SS N15G/R29W/ N39K/G55A/T56I/ I60V	2,69	823	0,60	-0,69	0,53	4,4	3,20	14,2

Die kinetischen Daten wurden durch Messung der Trp-Fluoreszenz in *stopped-flow*-Experimenten bestimmt. Angegeben sind die extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung k_{NU} und der Rückfaltung k_{UN} und die kinetischen m -Werte der Entfaltung (m_{NU}) und der Rückfaltung (m_{UN}). α ist die anteilige Änderung des Rückfaltungs- m -Wertes bezogen auf die Gesamtänderung ($\alpha = m_{\text{UN}} / (m_{\text{UN}} - m_{\text{NU}})$). Am Übergangsmittelpunkt sind die Ent- und Rückfaltungsraten identisch: $[\text{GdmCl}]_{1/2} = \ln(k_{\text{NU}} / k_{\text{UN}}) / (m_{\text{UN}} - m_{\text{NU}})$. Der Kooperativitätsparameter m wird aus den kinetischen m -Werten gemäß der Gleichung $m = R \cdot T \cdot (m_{\text{NU}} - m_{\text{UN}})$ berechnet. Die freie Enthalpie der Entfaltung $\Delta G_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}}$ berechnet sich aus den extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten gemäß $\Delta G_{\text{D}}^{25^\circ\text{C}} = -R \cdot T \cdot \ln(k_{\text{NU}} / k_{\text{UN}})$.

Die extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung k_{UN} und der Entfaltung k_{NU} der 0SS-G3P* N1-Domänen sind im Vergleich zur 3SS-G3P*-Variante größer. Die Denaturierungsmittelabhängigkeit der Faltungsraten ist für alle Varianten etwa gleich, d. h. die Denaturierungsmittelzugänglichkeit ändert sich damit nicht. Die m -Werte sind für die Varianten R29W / N39K / G55A / I60V und N15G / R29W / N39K / G55A / T56I / I60V im Vergleich zu den Daten aus den Gleichgewichtsübergängen (Tabelle 3.11) zu niedrig, dies hängt mit der Ungenauigkeit der kinetischen Daten aufgrund der Geschwindigkeitskonstanten und der Stabilität der N1-Domänen zusammen. Die Faltungsraten der sehr schnellen Reaktionen sind selbst durch *stopped-flow*-Messung nur schwer verlässlich meßbar. Die aus den kinetischen Daten erhaltenen Stabilitätsdaten weichen deshalb von den Gleichgewichtsdaten (Tabelle 3.11) ab, besonders für die Variante 0SS-G3P* R29W / N39K. Die kinetischen Daten bestätigen, daß die Stabilitätsunterschiede der 0SS-G3P*-Varianten untereinander auf den unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung beruhen. Die Rückfaltungsraten sind für alle Varianten in etwa gleich.

3.4.2 Faltungskinetiken des N1N2-Fragments

Die Fluoreszenzemissionsspektren der 0SS-G3P*-Varianten (3.2.4.2) und die zugehörigen Gleichgewichtsübergänge zeigen, daß die Änderungen der Tyr- und Trp-Fluoreszenz bei 320 nm bei diesen Varianten nicht als selektive Sonden für jeweils eine Domäne verwendet werden können. Bei dieser Wellenlänge sind sowohl Beiträge der N2- als auch der N1-Domäne zu beobachten. Die Trp-Fluoreszenz (360 bzw. 370 nm) ist jedoch nach wie vor für

N1 selektiv. Entfaltungs- und Rückfaltungsexperimente bei verschiedenen Wellenlängen geben daher Auskunft über die Faltung der beiden Domänen im N1N2-Fragment. Für die Beobachtung der Entfaltung von N2 in Gegenwart der gefalteten Domäne N1 wurde die Trp-Fluoreszenz des W181 in der N2-Domäne verwendet. Um die Faltung des disulfidfreien G3P* mit dem disulfidverbrückten Protein zu vergleichen, wurden Entfaltungs- und Rückfaltungsexperimente verschiedener 0SS-G3P*-Varianten analysiert.

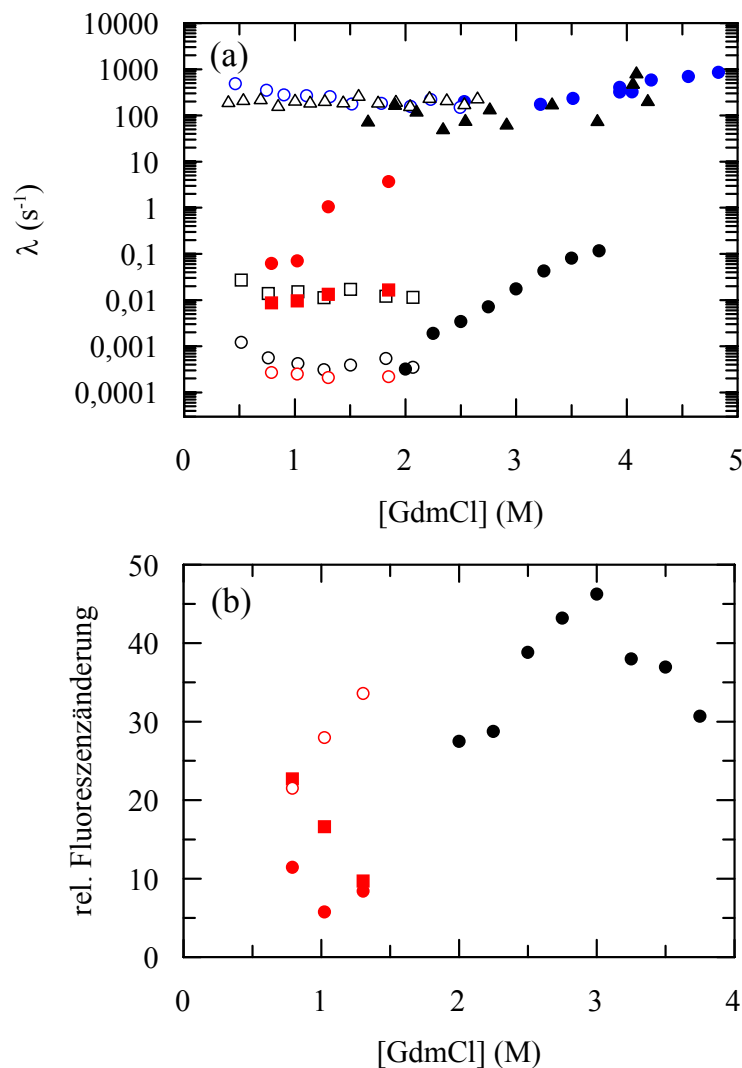


Abbildung 3.40: (a) Chevron-Auftragung der Entfaltungs- und Rückfaltungsraten von 0SS-G3P* R29W/N39K/F199L. (b) Amplituden der Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Dargestellt sind die Raten der Entfaltungs- (▲) und Rückfaltungsreaktionen (△) der N1-Domäne im N1N2-Fragment und der Entfaltungs- (●) und Rückfaltungsreaktionen (○) der isolierten N1-Domäne gemessen anhand der Trp-Fluoreszenz in *stopped-flow*-Experimenten. Die Rate der Entfaltungs- (●) und Rückfaltungsreaktionen (○, □) für das N1N2-Fragment wurden mittels Tyrosinfluoreszenz bei 305 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. Dargestellt sind außerdem die Raten der Rückfaltungsreaktion des N1N2-Fragments beobachtet anhand der Trp-Fluoreszenz bei 360 nm nach Anregung bei 280 nm (○, ●, ■). Alle Kinetiken wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C gemessen. Die Schichtdicke betrug 1 cm (Bandbreiten: 3 nm (Anregung), 5 nm (Emission)). Die Faltungsreaktionen der N1-Domäne wurden in *stopped-flow*-Experimenten anhand der Trp-Fluoreszenz gemessen.

Abbildung 3.40 zeigt die Chevron-Auftragung der Faltungsraten für die 0SS-G3P*-Variante R29W / N39K / F199L (Variante 41, Tabelle 3.7). Die Rückfaltungsreaktion der N1-Domäne im N1N2-Fragment wurde, wie die Faltung der isolierten N1-Domäne (vgl. Abbildung 3.39),

in *stopped-flow*-Experimenten gemessen und verläuft in wenigen ms. Die Entfaltung der N1-Domäne im N1N2-Fragment kann nur bei entfaltet vorliegender N2-Domäne unabhängig von der Domänen dissoziation betrachtet werden. Dies kann durch ein Doppelmischexperiment erreicht werden. Dabei wird das entfaltete N1N2-Fragment 1 s lang in 0,3 M GdmCl rückgefaltet. In dieser Zeit faltet die N1-Domäne, nicht aber die N2-Domäne. Ein anschließender Sprung in Entfaltungsbedingungen ermöglicht es so, die Entfaltung der N1-Domäne separat zu messen. Sowohl die Raten dieser Entfaltungs-, als auch die Raten der Rückfaltungsreaktionen stimmen mit den Faltungsraten der isolierten N1-Domäne (Abbildung 3.39) überein. Das bereits für das disulfidverbrückte G3P* festgestellte Abflachen des Verlaufs der Faltungsraten bei sehr niedrigen und hohen GdmCl-Konzentrationen im N1N2-Fragment (Martin und Schmid, 2003c) kann auch in diesem Fall beobachtet werden. Bei 0,5 M GdmCl faltet die N1-Domäne mit einer Zeitkonstante von 4,9 ms. Die Summe der kinetischen *m*-Werte stimmt für die N1-Domäne nicht mit dem Gleichgewichts-*m*-Wert überein. Zusammen mit dem Amplitudenverlust bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen läßt dies, wie beim Referenzprotein 3SS-G3P*, auf die Existenz eines Intermediats schließen. Außerdem wird bei der disulfidfreien Variante die Entfaltung der N1-Domäne sehr stark verlangsamt, wenn die N2-Domäne nativ gefaltet und mit N1 assoziiert vorliegt, ebenfalls wie beim disulfidverbrückten Referenzprotein 3SS-G3P*.

Die Entfaltung und Rückfaltung der N2-Domäne ist langsam und verläuft in zwei Schritten. Sie kann nach manueller Mischung anhand von zwei verschiedenen Sonden (Tyr- und Trp-Fluoreszenz) beobachtet werden. Beide Sonden liefern übereinstimmende Daten für die Entfaltungs- und die Rückfaltungsreaktionen im N1N2-Fragment. Auch im disulfidfreien G3P* können zwei Rückfaltungsphasen für N2 beobachtet werden. Mit Zeitkonstanten von 37 s bzw. 826 s (in 0,5 M GdmCl) sind sie 5- bzw. 20-mal langsamer als beim disulfidverbrückten Protein. Die Entfaltung des disulfidfreien N1N2-Fragments ist hingegen um etwa eine Zehnerpotenz schneller als im disulfidverbrückten G3P*. Die Entfaltung konnte für das disulfidfreie G3P* ebenfalls als monoexponentielle Funktion beobachtet werden.

Tabelle 3.16: Zeitkonstanten der Rückfaltungs- und Entfaltungsphasen der 0SS-G3P*-Varianten im Vergleich zum disulfidverbrückten Referenzprotein G3P*.

Nr.	G3P*-Varianten	Rückfaltung in 0,5 M GdmCl			Entfaltung in 4,5 M GdmCl	
		τ_1 (s) (N1)	τ_2 (s) (N2)	τ_3 (s) (N2)	τ_4 (s) (N1)	τ_5 (s) (N1N2)
2	3SS G3P*	0,0094	7	42	0,028	71
19	0SS R29W/N39K/F199L	0,0021	37	826	0,004	-
21	0SS N15G/R29W/ N39K/G55A/F199L	0,0017	46	1538	0,020	2
23	0SS N15G/R29W/ N39K/G55A/T56I/ I60V/N138G/L198P/ F199L/S207L	0,0027	3	81	0,013	161

Aufgeführt sind die sehr schnelle Faltungsphase der N1-Domäne (τ_1), die beiden Faltungsphasen der N2-Domäne (τ_2 und τ_3) in 0,5 M GdmCl sowie die Entfaltungsphasen der N1-Domäne (τ_4) und des N1N2-Fragments (τ_5) in 4,5 M GdmCl. Für die maximal stabilisierte 0SS-G3P*-Variante ist dabei die langsame Entfaltungsphase angegeben, welche die größere Amplitude besitzt.

Die Zeitkonstanten der Faltungs- und Entfaltungsphasen sind in Tabelle 3.16 aufgeführt. Für die OSS-G3P*-Variante N15G / R29W / N39K / G55A / F199L (Variante 21, Tabelle 3.2) sind in Abbildung 3.41 beispielhaft Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken bei Betrachtung mit verschiedenen Fluoreszenzsonden gezeigt.

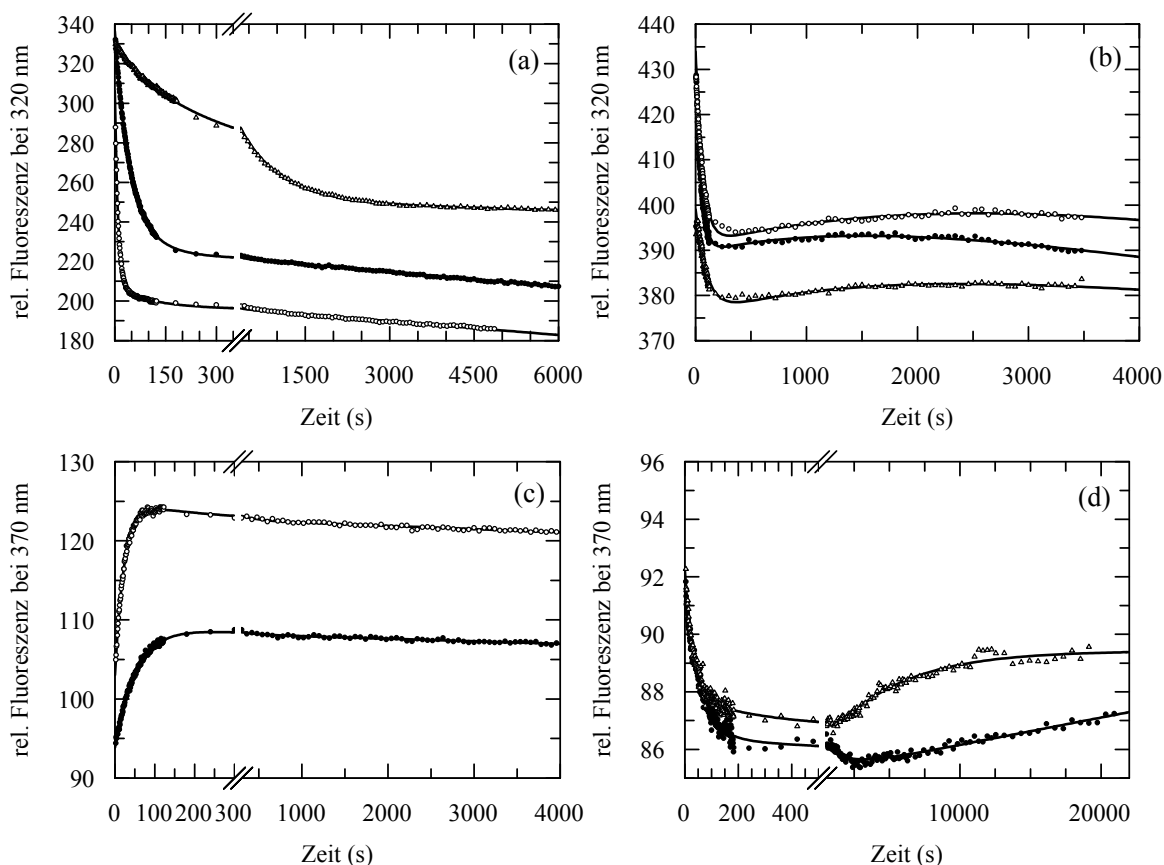


Abbildung 3.41: Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken von OSS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/F199L. (a) Entfaltungskinetiken beobachtet anhand der Fluoreszenz bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm in Gegenwart von 4 M (○), 3,5 M (●) und 2,75 M (Δ) GdmCl. (b) Rückfaltungskinetiken beobachtet anhand der Fluoreszenz bei 320 nm in Gegenwart von 0,5 M (●), 0,75 M (○) und 1,0 M (Δ) GdmCl. (c) Entfaltungskinetiken beobachtet anhand der Trp-Fluoreszenz bei 370 nm nach Anregung bei 295 nm bei 3,5 M (●) und 3,75 M (○) GdmCl. (d) Rückfaltungskinetiken beobachtet anhand der Trp-Fluoreszenz bei 370 nm in Gegenwart von 2,0 M (●) und 2,5 M (Δ) GdmCl. Die Kinetiken wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C und einer Schichtdicke von 1 cm (Bandbreiten: 5 nm (Anregung), 10 nm (Emission)) gemessen.

Bei Entfaltung nimmt das Fluoreszenzsignal bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm ab, bei der Rückfaltung des Proteins sind gegenläufige Amplituden der beiden Phasen zu beobachten. Hier folgt der Fluoreszenzabnahme in der schnellen Phase eine langsame Phase, die durch eine Zunahme der Fluoreszenz gekennzeichnet ist. Abbildung 3.41 a und b zeigen, daß die Amplituden der schnellen Phase in Ent- und Rückfaltung gleichgerichtet sind. Dies könnte ein Hinweis auf ein hyperfluoreszentes Intermediat sein. Die Entfaltungsreaktion verfolgt mittels der Trp-Fluoreszenz nach selektiver Anregung bei 295 nm ist durch eine Fluoreszenzzunahme gekennzeichnet. Für die Rückfaltung ergibt sich ein ähnlicher Verlauf wie bei 320 nm, einer schnellen Abnahme der Fluoreszenz folgt eine langsame Fluoreszenzzunahme. Die Amplitude

bei selektiver Anregung der Tryptophane ist sehr klein, deshalb ist die Beobachtung der Faltungsreaktion anhand der Fluoreszenz bei 320 nm günstiger. Beide Sonden liefern jedoch übereinstimmende Ergebnisse für die Faltungsraten des N1N2-Fragments. Die Chevron-Auftragung der Faltungsraten ist in Abbildung 3.42 a dargestellt.

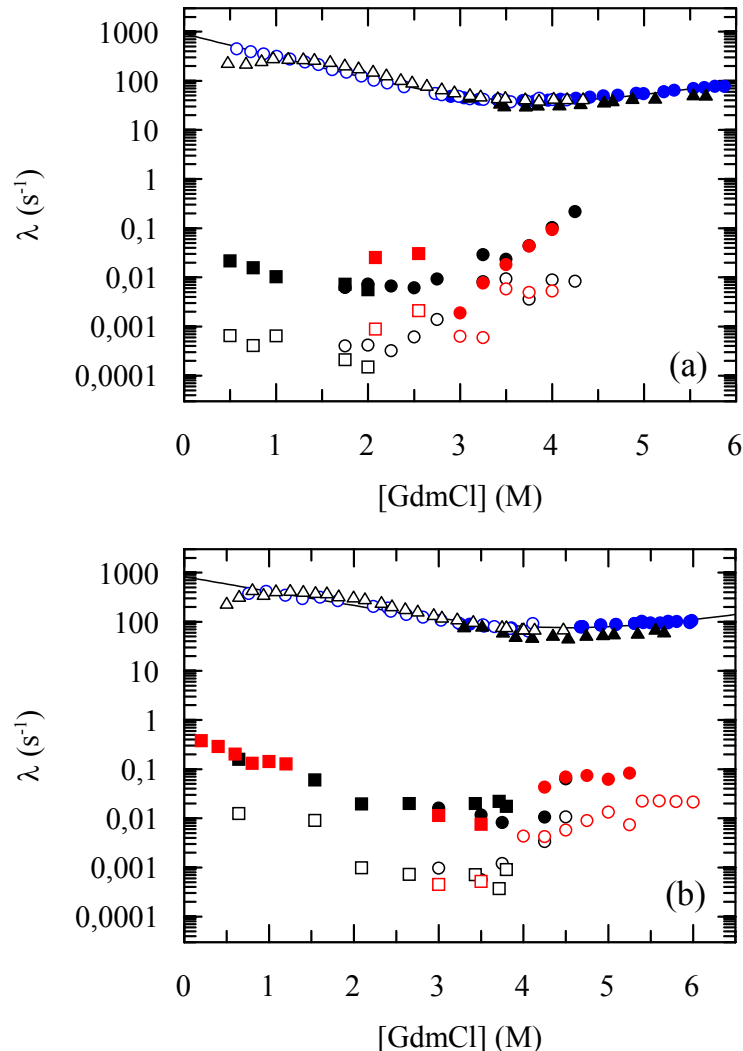


Abbildung 3.42: Chevron-Auftragung für (a) 0SS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/F199L und (b) 0SS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V/N138G/L198P/F199L/S207L. Dargestellt sind die Raten der Entfaltungs- (▲) und Rückfaltungsreaktionen (Δ) der N1-Domäne im N1N2-Fragment und der Entfaltungs- (●) und Rückfaltungsreaktionen (○) der isolierten N1-Domäne gemessen anhand der Trp-Fluoreszenz oberhalb von 350 nm in *stopped-flow*-Experimenten. Die Rate der Entfaltungs- (●, ○) und Rückfaltungsreaktionen (■, □) für das N1N2-Fragment wurden mittels Tyrosinfluoreszenz bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm verfolgt. (a) Dargestellt sind außerdem die Raten der Entfaltungs- (○, ●) und Rückfaltungsreaktion (■, □) des N1N2-Fragments beobachtet anhand der Trp-Fluoreszenz bei 370 nm nach Anregung bei 295 nm. (b) Die Rückfaltungsraten der N2-Domäne in Gegenwart der gefalteten N1-Domäne (■, □) und die Entfaltungsraten der nichtassoziierten Domänen (●, ○) wurden in Doppelmischexperimenten gemessen. Alle Kinetiken wurden mit 0,5 μM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C gemessen. Die Schichtdicke betrug 1 cm (Bandbreiten: 3 nm (Anregung), 5 nm (Emission)). Die Faltungsreaktionen der N1-Domäne wurden in *stopped-flow*-Experimenten anhand der Trp-Fluoreszenz gemessen.

Die Chevron-Auftragung der Faltungsraten von 0SS-G3P* N15G / R29W / N39K / G55A / F199L bestätigt die Ergebnisse für die Faltung von 0SS-G3P* R29W / N39K / F199L. Die Entfaltung und Rückfaltung der N1-Domäne im N1N2-

Fragment stimmt wieder mit den Reaktionen der isolierten N1-Domäne überein. Für die Rückfaltung des N1N2-Fragments sind bei 320 nm und bei 370 nm zwei Phasen meßbar, die etwa um den Faktor 6 (τ_2) bzw. 40 (τ_3) langsamer sind (in 0,5 M GdmCl) als im disulfidverbrückten G3P*, die Entfaltung ist hingegen etwa um den Faktor 35 schneller (Tabelle 3.16). Da bei dieser Variante die N2-Domäne die gleichen Mutationen enthält wie N2 in 0SS-G3P* R29W / N39K / F199L, ist die Faltungskinetik der N2-Domäne für beide Varianten gleich. Der Verlauf der Amplituden in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration ist hier nicht dargestellt, da die Kinetiken unter unterschiedlichen Bedingungen (Lampenwechsel) gemessen wurden.

Abbildung 3.42 b zeigt die Ent- und Rückfaltungsraten für die stabilste disulfidfreie G3P*-Variante (0SS-G3P* N15G / R29W / N39K / G55A / T56I / I60V / N138G / L198P / F199L / S207L, Variante 23, Tabelle 3.2) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Auch hier stimmen die Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen der isolierten N1-Domäne und der N1-Domäne im N1N2-Fragment sehr gut überein. Aus den kinetischen Daten ergibt sich, ebenso wie im Gleichgewichtsübergang (Tabelle 3.11), der Übergangsmittelpunkt von 3,7 M GdmCl.

3.4.3 *Faltungskinetik der N2-Domäne*

Für die beiden Rückfaltungsphasen des N1N2-Fragments der stabilsten disulfidfreien G3P*-Variante ergeben sich vergleichbare Faltungsraten wie für die bereits betrachteten 0SS-G3P*-Varianten. Um die Rückfaltungsphasen genauer zuordnen zu können, wurden Doppelmischexperimente durchgeführt. Da die Faltung der N1-Domäne innerhalb von ms abgeschlossen ist, die Domänenassoziation hingegen einige Stunden dauert, kann die Faltung der N2-Domäne im ungedockten Zustand untersucht werden. Die Rückfaltung von N2 in Gegenwart von bereits gefalteter N1-Domäne wurde durch ein Doppelmischexperiment analysiert. Durch kurzzeitiges Rückfalten (1 s) des Proteins in 0,5 M GdmCl wurde die Faltung der N1-Domäne initiiert. Um die Rückfaltung der N2-Domäne zu beobachten, wurde das Protein dann in 0,2-1,2 M GdmCl überführt. Für das disulfidverbrückte G3P* konnte durch entsprechende Experimente festgestellt werden, daß die gemessene Faltungsrate mit der schnellen Phase aus den Rückfaltungsreaktionen des N1N2-Fragments übereinstimmt. Dies trifft auch auf die disulfidfreie G3P*-Variante zu. Die Entfaltung der N2-Domäne in Abwesenheit der Domänenassoziation wurde ebenfalls anhand eines Doppelmischexperiments untersucht. Das Protein wurde in diesem Fall fünf Minuten in 0,5 M GdmCl rückgefaltet, so daß sowohl N1 als auch N2 gefaltet vorlagen, die Domänenassoziation jedoch noch nicht abgeschlossen war. Die so gefalteten Domänen wurden dann in 3-5 M GdmCl wieder entfaltet. Die Faltungsraten bestätigen die Ergebnisse aus den Entfaltungsreaktionen des N1N2-Fragments. In Abbildung 3.43 sind beispielhaft Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktionen aus den Doppelmischexperimenten dargestellt, die Faltungsraten sind in der Chevron-Auflastung in Abbildung 3.42 abgebildet.

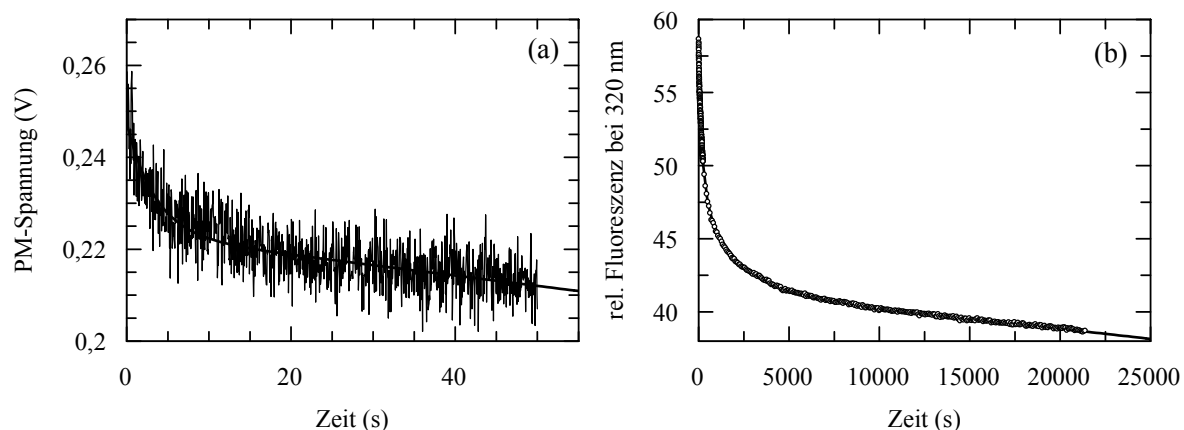


Abbildung 3.43: Faltungskinetik der OSS-G3P*-Variante mit allen stabilisierenden Mutationen. (a) Rückfaltungskinetik von N2 in 0,4 M GdmCl in Gegenwart der gefalteten N1-Domäne beobachtet anhand der Trp-Fluoreszenz im *stopped-flow*-Doppelmischexperiment. (b) Entfaltungskinetik von N1N2 in 3,6 M GdmCl in Abwesenheit der Domänenassoziation verfolgt anhand der Fluoreszenz bei 320 nm nach Anregung bei 280 nm. Die Kinetiken wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C gemessen.

Im Vergleich zu den OSS-G3P*-Varianten mit der Mutation F199L in N2 (Varianten 21 und 41, Tabelle 3.7) sind die Rückfaltungsraten für die stabilste disulfidfreie Variante (Variante 23, Tabelle 3.7) erhöht, die Entfaltung ist verlangsamt (Tabelle 3.16). Dies ist eine Konsequenz der zusätzlichen stabilisierenden Mutationen in N2 (N138G / L198P / S207L). Im Vergleich zum disulfidverbrückten Referenzprotein G3P* sind die Zeitkonstanten der Faltung des maximal stabilisierten OSS-G3P* etwa gleich, die Entfaltung bei 4,5 M GdmCl ist um etwa den Faktor zwei langsamer.

Die Domänenassoziationsreaktion wurde für die disulfidfreien G3P*-Varianten nicht untersucht. Für das disulfidverbrückte Protein konnte festgestellt werden, daß die Assoziationsreaktion der bereits gefalteten Domänen nicht von der Stabilität der einzelnen Domänen beeinflusst wird (Martin und Schmid, 2003c).

3.4.4 Vergleich der Faltungskinetik von 3SS-G3P* und OSS-G3P*

Die stabilste OSS-G3P*-Variante (Variante 23, Tabelle 3.2) unterscheidet sich vom disulfidverbrückten Referenzprotein 3SS-G3P* durch den Ersatz der drei Disulfidbrücken und durch zehn weitere stabilisierende Mutationen. Trotz dieser massiven Veränderung der Primärsequenz ändert sich der prinzipielle Faltungsmechanismus nicht. Zuerst faltet die N1-Domäne im ms-Bereich, erst dann faltet die N2-Domäne im s- bis min-Bereich, und schließlich assoziieren die Domänen fest. Bei genauerer Betrachtung der isolierten N1-Domänen fällt auf, daß die disulfidfreien N1-Domänen generell um den Faktor zehn schneller falten als das disulfidverbrückte Referenzprotein. Weitere stabilisierende Mutationen verringern die Entfaltungsrate der entsprechenden OSS-G3P*-Varianten (Varianten 21 und 23, Tabelle 3.2) und wirken damit auf den nativen Zustand des Proteins. Für die Rückfaltung können auch im disulfidfreien Protein neben der schnellen Phase der N1-Domäne zwei Phasen der N2-Domäne detektiert werden, die im Vergleich zum disulfidverbrückten Protein um eine Zehnerpotenz verlangsamt sind. Im Vergleich der OSS-G3P*-Varianten zeigt sich ein

generelles Muster: stabilisierende Mutationen erhöhen die Faltungs- und verringern die Entfaltungsraten. Wie im disulfidverbrückten G3P ist hier von einem Mechanismus auszugehen, bei dem die Faltung der beiden Domänen und die Domänenassoziation getrennt erfolgen. Dieser Mechanismus ist eng mit der Funktion des G3P gekoppelt. Da die OSS-G3P-Varianten aus einer *Prosider*-Selektion hervorgegangen sind, ist die Aufrechterhaltung der Funktion zwingend.

Neben dem hier beschriebenen Mechanismus gibt es weitere mögliche Faltungsmechanismen für Zwei-Domänen-Proteine. Liegen die Domänen nur in Gegenwart der jeweils anderen Domäne gefaltet vor, müssen die Faltung der Domänen und die Domänenassoziation gekoppelt sein, damit der native Zustand erreicht werden kann (Garel, 1992; Jaenicke, 1999). Dieses Modell könnte auf die instabilen OSS-G3P*-Varianten zutreffen. Für diese Varianten mit hochkooperativer Entfaltungsreaktion könnte die Analyse des Faltungsmechanismus Aufschluß über den Funktionsverlust geben (Phagen mit einem solchen G3P sind nicht infektiös) bzw. die Bedeutung des Faltungsmechanismus für den Verlauf der Infektion bestätigen.

3.5 Untersuchung der C-terminalen Domäne des Gen-3-Proteins

Bislang wurden nur die beiden N-terminalen Domänen des G3P hinsichtlich ihrer Stabilität und Faltung untersucht. Diese sind, wie ausführlich in 3.1 und 3.2 erläutert, für die Infektion verantwortlich. Die C-terminale Domäne verankert das G3P in der Phagenhülle (Boeke und Model, 1982; Crissman und Smith, 1984; Stengele *et al.*, 1990; Kremser und Rasched, 1994) und ist für die Freisetzung der Phagenpartikel von der Wirtszelle verantwortlich. Eine Konformationsänderung in CT führt zur Zerstörung der hydrophoben Interaktionen zwischen Virion und Wirtszellmembran (Rakonjac *et al.*, 1999). Neben dieser Funktion bei der Phagenassemblierung ist die CT-Domäne auch am Infektionsprozeß beteiligt. Bennett und Rakonjac konnten neben der bisher angenommenen Funktion als bloßer *Linker* zwischen N-terminalen Domänen und Phagenhülle eine aktive Beteiligung der CT-Domäne am Infektionsprozeß nachweisen (Bennett und Rakonjac, 2006). Es wird angenommen, daß die Bindung von N1 an den sekundären Rezeptor TolA eine konformationelle Änderung in der CT-Domäne induziert, die zur Exposition hydrophober Bereiche von G3P und G6P führt und damit die Insertion des Virions in die Wirtszellmembran ermöglicht. Frühere Experimente zur Insertion von Gastproteinen zwischen den Domänen des G3P haben diese Bedeutung der CT-Domäne für den Infektionsprozeß bereits angedeutet (Krebber *et al.*, 1997). Ein solcher Infektionsmechanismus der filamentösen Phagen ist dem Mechanismus eukaryontischer Viren ähnlich. Nach Wechselwirkung mit einem sekundären Rezeptor exponieren diese durch eine Konformationsänderung Peptidabschnitte (Fusionspeptide), welche in die Wirtszellmembran insertieren. Eine eingehende Analyse von Struktur und Faltung der CT-Domäne ist daher einerseits vor dem Hintergrund des Zusammenwirkens mit N1N2 und andererseits für die Aufklärung viraler Infektionsprozesse von Interesse. Ein genauerer Überblick über die Infektionsmechanismen filamentöser Phagen ist vor allem auch für die verschiedenen Anwendungen des *phage display* wichtig. Die detaillierte Kenntnis der bei der Infektion beteiligten Reste könnte vor allem für SIP und *Proside* den Einbau von Gastproteinen erleichtern. Der Einfluß der CT-Domäne auf Stabilität und Faltung des N1N2-Fragments ist dabei die Voraussetzung für das Verständnis der Funktionsweise des Dreidomänenproteins auf molekularer Ebene.

Die C-terminale Domäne läßt sich in zwei funktionale Domänen unterteilen. Domäne 1 umfaßt die Reste 257-313. Diese Domäne ist am *capping* des Phagen beteiligt. Domäne 2 umfaßt die Reste 314-406 und ist für die Verankerung des G3P in der Phagenhülle und das Verlassen der Wirtszellmembran verantwortlich (Weiss *et al.*, 2003). Diese funktionale Unabhängigkeit der Domänen konnte durch den Einbau von Polypeptiden zwischen die Domänen bestätigt werden. Die entsprechenden Phagen sind weiterhin infektiös (Daten nicht gezeigt). Ein Modell der Struktur der CT-Domäne, das nach Algorithmen von Pollastri und Baldi erstellt wurde (Weiss *et al.*, 2003), ist in Abbildung 3.44 dargestellt.

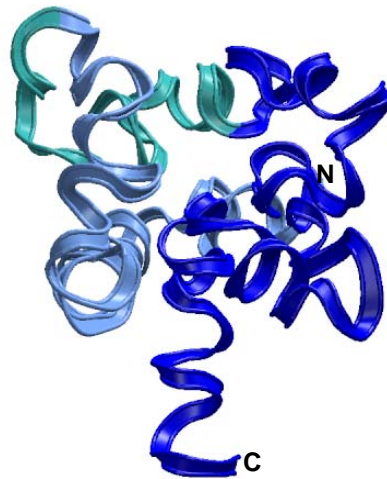


Abbildung 3.44: Modell der Struktur der CT-Domäne des G3P. Das Modell beschreibt die Struktur der Aminosäuren 257-406 und wurde von Pollastri und Baldi erstellt (Weiss *et al.*, 2003). Domäne C1 (Aminosäuren 257-313) ist in hellblau dargestellt, Domäne C2 (Aminosäuren 337-406) in dunkelblau. Die Reste 314-337, die für das Verlassen der Wirtszelle verantwortlich sind, sind in cyan dargestellt.

3.5.1 Ersatz der Disulfidbrücke C354-C371 in der C-terminalen Domäne

Vor dem Hintergrund der Analyse des disulfidfreien G3P (3.1) ist in diesem Zusammenhang auch die Bedeutung der Disulfidbrücke in der CT-Domäne an den Positionen C354-C371 von Interesse. Um den Einfluß dieser Disulfidbrücke auf die Infektiosität der Phagen zu untersuchen, wurde die Disulfidbrücke zunächst gegen ein Ala / Leu-Paar ausgetauscht. Dieser Phage wurde als Ausgangspunkt für eine *Proside*-Selektion verwendet, in der ein optimaler Ersatz für diese Disulfidbrücke gefunden werden sollte. Der C354A / C371L-Phage war weiterhin infektiös. Eine Randomisierung der Cys-Positionen mit anschließender *Proside*-Selektion führte jedoch nicht zum Erfolg. Eventuell könnte die CT-Domäne für die Protease nicht zugänglich sein, so daß keine Selektion stabilisierter Phagen möglich ist.

3.5.2 Klonierung und Reinigung der verschiedenen G3P-Konstrukte mit C-terminaler Domäne

Die Struktur der C-terminalen Domäne ist bislang nicht bekannt. Aufgrund des hydrophoben C-terminalen Teils zur Verankerung der CT-Domäne in der Phagenhülle gelang die Kristallisation bislang nicht. Für die Struktur existiert lediglich das Modell in Abbildung 3.44, das von einer C-terminalen Helix zur Verankerung in der Wirtszellmembran ausgeht. Die CT-Domäne umfaßt 150 Aminosäuren, die in zwei funktionalen Domänen organisiert sein sollen (Weiss *et al.*, 2003).

Zur Expression der isolierten CT-Domäne wurde diese zunächst um den C-terminalen hydrophoben Teil (Aminosäuren 379-406), der laut Strukturvorhersage eine hydrophobe Helix bildet, verkürzt. Das entsprechende Protein (Aminosäure 257-378) ist zwar exprimierbar und löslich, liegt jedoch nicht gefaltet vor (Stöckl, 2005). Deshalb wurde diese verkürzte Form von CT zusammen mit den beiden N-terminalen Domänen des G3P

exprimiert. Auch hier zeigte sich bereits während der Reinigung, daß die CT-Domäne entfaltet vorlag. Sie wurde innerhalb kurzer Zeit proteolysiert, so daß lediglich das N1N2-Fragment übrigblieb. CT ist ohne die C-terminale Helix (Reste G379-S406) offensichtlich weder isoliert noch im Komplex mit N1 und N2 gefaltet und damit während der Expression und Reinigung auch nicht vor Proteolyse geschützt.

Die Expression von N1N2CT mit der C-terminalen Helix (also des kompletten Dreidomänenproteins) war aufgrund der Hydrophobizität der zusätzlichen Reste nicht selbstverständlich. Das Dreidomänenprotein konnte exprimiert und aus *inclusion bodies* gereinigt werden, wobei es während der Reinigung nicht proteolysiert wurde. Auch die isolierte CT-Domäne ließ sich mit der C-terminalen Helix, also als vollständige Domäne (Reste 257-406), überexprimieren und reinigen. Außerdem wurde das Zweidomänenprotein N2-CT überexprimiert und gereinigt. Aufgrund der Instabilität beider Domänen war die Reinigung in diesem Fall allerdings schwierig.

Alle G3P-Konstrukte mit CT-Domäne beruhen auf der stabilisierten Vierfachmutante G3P*. Entsprechend dem in der Selektion verwendeten Phagen ist der *Linker* zwischen der N2- und der CT-Domäne in diesen Konstrukten verkürzt (Martin *et al.*, 2003 a). Eine Betrachtung des Wildtyp-Proteins ist somit nicht möglich. Die G3P-Konstrukte mit CT-Domäne ermöglichen aber die Untersuchung des G3P wie es in der *Proside*-Selektion verwendet wird.

3.5.3 Vergleich der Proteolyseresistenz der verschiedenen G3P*-Konstrukte

Die verschiedenen G3P*-Konstrukte wurden einer Proteolyse mit Chymotrypsin unterworfen, um Informationen darüber zu erhalten, ob die Proteine strukturiert und damit für die Protease unzugänglich sind oder ob die CT-Domäne ungefaltet vorliegt. Abbildung 3.45 und Abbildung 3.46 zeigen die SDS-Polyacrylamidgele der Proteinproben nach unterschiedlich langen Proteolysezeiten.

In Abbildung 3.45 a ist reduzierte und carboxymethylierte RNase T1 (RCM-T1) als Referenz für ein ungefaltetes Protein gezeigt. Es wird innerhalb von 30 s fast vollständig abgebaut. Im Vergleich dazu sind in Abbildung b die Ansätze der Proteolyse der isolierten CT-Domäne zu sehen. Ähnlich wie bei der RCM-T1 ist nach 30 s der Großteil des Proteins abgebaut, nach 2 min ist es vollständig proteolysiert. In Abbildung c ist die Proteolyse des Zweidomänenkonstrukts G3P* N2-CT dargestellt. G3P* N2-CT ist deutlich stabiler gegenüber Chymotrypsin als die isolierte CT-Domäne allein. Bereits nach 30 s beginnt jedoch auch hier die Spaltung des Proteins. Dabei wird zunächst nur ein kleiner Teil abgespalten, und es wird ein Zwischenprodukt gebildet, das deutlich größer ist als N2. Es wird im weiteren Verlauf in N2 umgewandelt. Die Fragmente können jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden, hier wäre eine massenspektrometrische Analyse der Gelfragmente zur genaueren Analyse notwendig. Die Proteolyse deutet jedoch daraufhin, daß CT in diesem Konstrukt deutlich stabilisiert ist und nur noch langsam durch Chymotrypsin abgebaut wird.

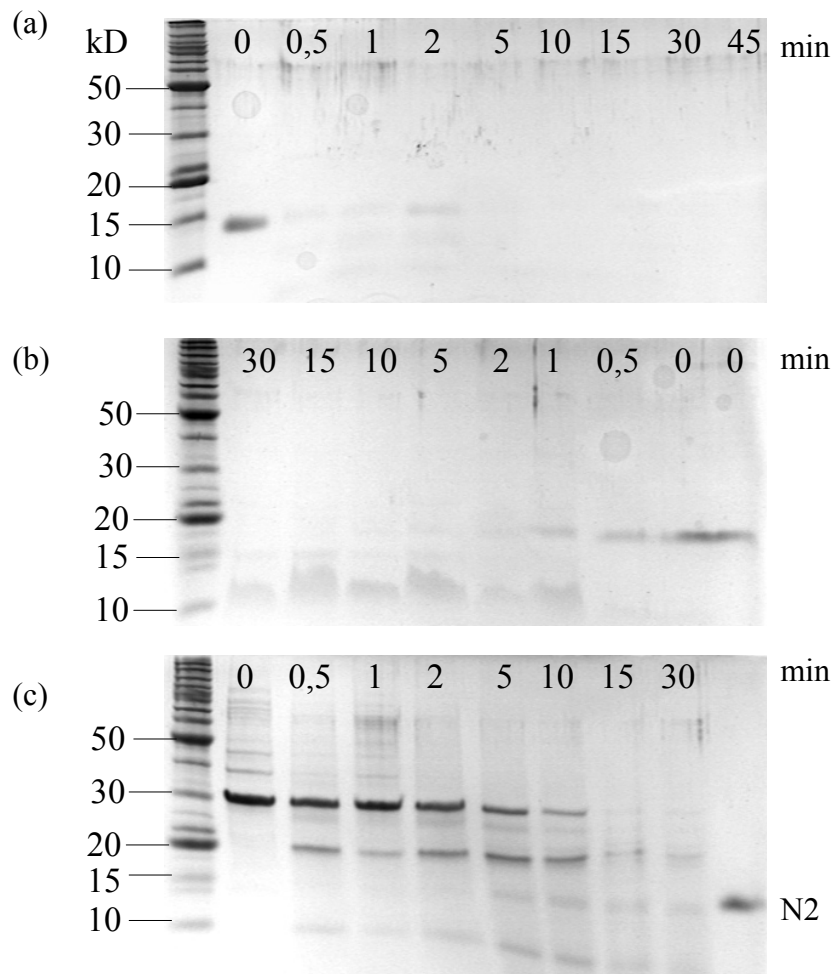


Abbildung 3.45: Proteolyse der verschiedenen G3P*-Konstrukte. (a) Reduzierte carboxymethylierte RNase T1 (RCM-T1) zum Vergleich als Beispiel für ein ungefaltetes Protein, (b) isolierte CT-Domäne, (c) G3P* N2-CT. Die Proteolyse wurde mit 5 µg/ml Chymotrypsin im Verhältnis 50 : 1 (w/w) (Protein : Protease) bei 25 °C im Zeitbereich 0 - 15 min durchgeführt. Auf Bahn 1 ist jeweils der Längenstandard aufgetragen, auf den Bahnen 2-10 die Proteinproben nach 0-30 min Proteolyse. In (c) ist auf Bahn 10 die isolierte N2-Domäne zum Vergleich aufgetragen. In (b) sind die Proben in umgekehrter Reihenfolge aufgetragen (Bahn 2: 30 min Proteolyse, Bahn 10: 0 min Proteolyse).

Abbildung 3.46 vergleicht die Proteolysestabilitäten der beiden Zweidomänenfragmente G3P* N2-CT und G3P* N1N2 und des Volllängenproteins G3P* N1N2CT. In diesem Fall wurde die Proteolyse über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet. G3P* N2CT (Abbildung 3.46 a) ist nach 15 min komplett abgebaut. Dieses Ergebnis bestätigt das Ergebnis des ersten Proteolyseansatzes (Abbildung 3.45 c) für dieses Konstrukt und dient damit als Maß für die Vergleichbarkeit der Experimente. G3P* N1N2 ist über den gesamten Zeitraum von 180 min proteasestabil (Abbildung 3.46 b). Im Fall des gesamten G3P*-Proteins N1N2CT sind bereits nach 5 min Abbauprodukte erkennbar. Zunächst wird nur ein kurzer Bereich abgebaut, nach 15 min sind deutlich drei Fragmente zu erkennen, die von ihrer Größe her jedoch nicht eindeutig zuzuordnen sind. Bei der Proteolyse bleibt nicht das N1N2-Fragment nach Proteolyse als Fragment übrig, sondern ein Fragment höheren Molekulargewichts. Auch hier kann nur eine massenspektrometrische Analyse der

Gelfragmente genauere Auskunft geben. Festzuhalten bleibt jedoch, daß im N1N2CT-Konstrukt CT weniger proteaseanfällig und damit strukturierter vorliegt als die isolierte CT-Domäne.

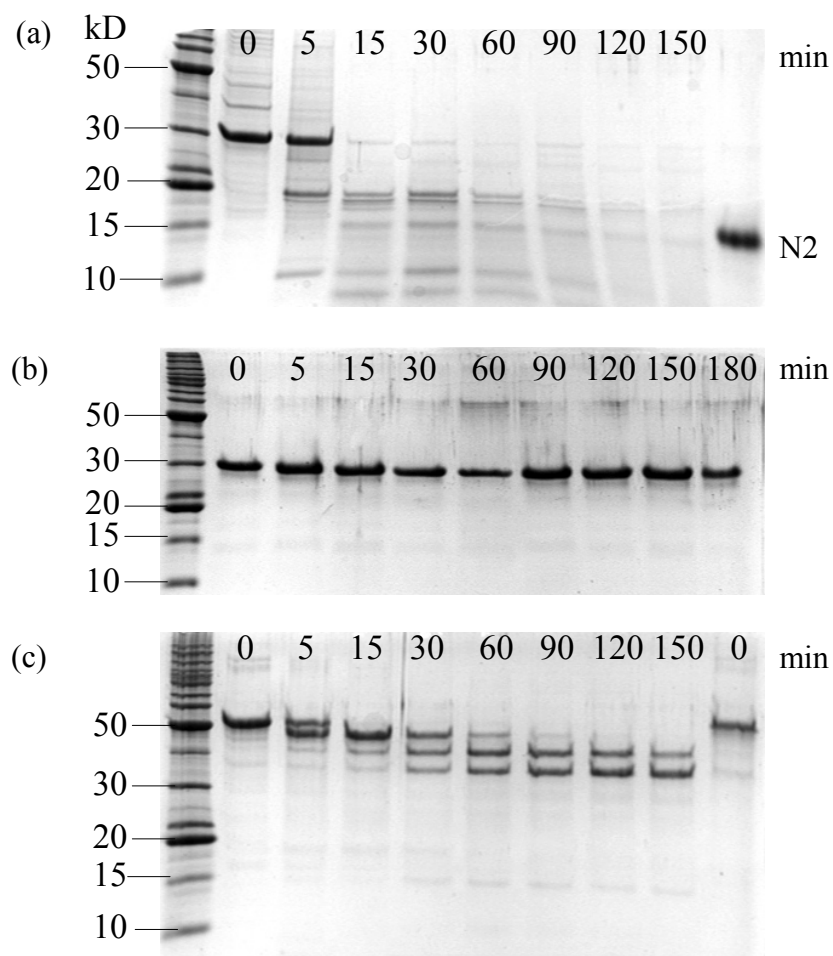


Abbildung 3.46: Proteolyse der verschiedenen G3P*-Konstrukte. (a) G3P* N2-CT, (b) G3P* N1N2, (c) G3P* N1N2CT. Die Proteolyse wurde mit 5 µg/ml Chymotrypsin im Verhältnis 50 : 1 (w/w) (Protein : Protease) bei 25 °C im Zeitbereich 0-180 min durchgeführt. Auf Bahn 1 ist jeweils der Längenstandard aufgetragen, auf den Bahnen 2-10 die Proteinproben nach 0-180 min Proteolyse. In (a) ist auf Bahn 10 die isolierte N2-Domäne zum Vergleich aufgetragen.

3.5.4 Spektroskopische Charakterisierung der G3P-Konstrukte

3.5.4.1 Isolierte CT-Domäne

Die isolierte CT-Domäne umfaßt 157 Aminosäuren (inklusive His₆-Tag). Es sind sieben Tyrosinreste, jedoch kein Tryptophan vorhanden, was die Charakterisierung anhand der Fluoreszenz erschwert. Sowohl Fluoreszenzspektren als auch Fern-UV-CD-Spektren der CT-Domäne in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an GdmCl zeigen keine Signaländerung. Der Versuch einer thermischen Denaturierung der CT-Domäne, verfolgt anhand verschiedener Sonden, bestätigt dieses Ergebnis. Weder mittels CD- noch mittels Absorption können mit zunehmender Temperatur Änderungen in den Spektren beobachtet werden. Abbildung 3.47 a zeigt die Fern-UV-CD-Spektren, Abbildung 3.47 b die Absorptionsspektren bei verschiedenen Temperaturen.

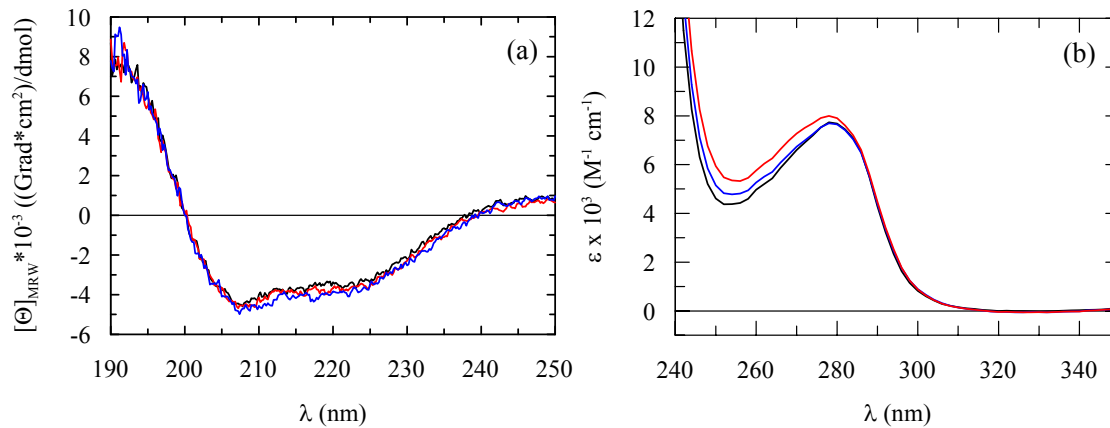


Abbildung 3.47: (a) Fern-UV-CD-Spektren der isolierten CT-Domäne des G3P bei verschiedenen Temperaturen, 20 °C (–), 40 °C (–), 60 °C (–). Die Spektren wurden mit 4 μM Protein in 10 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0, einer Bandbreite von 1 nm, einer Geschwindigkeit von 20 nm/min bei einer Dämpfung von 1 s und einer Schichtdicke von 1 mm gemessen. (b) Absorptionsspektren zwischen 240 und 350 nm der isolierten CT-Domäne des G3P, 20 °C (–), 49,5 °C (–), 75 °C (–). Die Spektren wurden mit 7,5 μM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die Spektren sind um den Beitrag des Streulichts durch aggregiertes Protein korrigiert.

Die CD-Spektren zeigen die für α -helikale Struktur typischen Minima bei 208 nm bzw. 222 nm. Dies spricht für das Vorhandensein von Helix-Bereichen im Protein. Bei thermischer Denaturierung ist jedoch kein Unterschied in den CD-Spektren erkennbar. Möglicherweise ist die CT-Domäne bis auf die C-terminale Helix unstrukturiert. Diese liefert das CD-Signal über den Temperaturbereich von 20–60 °C. Der $[\Theta]_{MRW}$ -Wert von etwa -4 000 (bei 222 nm) deutet an, daß 10–15 % (16–23 Reste) des Proteins helikal vorliegen. Dies würde etwa der Länge einer Transmembranhelix entsprechen. Zusammen deuten diese Experimente an, daß die isolierte CT-Domäne bis auf die C-terminale Helix unstrukturiert vorliegt und unterstützen damit das Ergebnis der Proteolyse mit Chymotrypsin, die zu einem schnellen Abbau des Proteins führt. Die helikale Struktur ist mindestens bis 60 °C stabil.

3.5.4.2 G3P* N2-CT

Für die Untersuchung des Zweidomänenproteins G3P* N2-CT wurden zwei verschiedene Konstrukte kloniert, die sich in der Größe des N2-Fragments unterscheiden. Zum einen wurde das Fragment ab P90 bis S407, also einschließlich der Gelenk-Subdomäne, kloniert, zum anderen wurde lediglich der globuläre Teil von N2 mit CT kombiniert, d.h. Y102 bis S407. Beide Konstrukte enthalten die Mutationen aus G3P*, also Q129H bzw. zusätzlich T101I. Ferner ist der *Linker* zwischen N2 und CT (wie im entsprechenden Phagen) zwischen P230 und D257 verkürzt. Das gesamte Konstrukt umfaßt damit 311 bzw. 300 Aminosäuren. Beide Zweidomänenkonstrukte konnten in *E. coli* BL21 überexprimiert werden. Für die weitere Analyse wurde das N2-CT-Konstrukt ohne Gelenk-Subdomäne verwendet. N2-CT enthält ein Tryptophan und 17 Tyrosinreste. In Abbildung 3.48 sind die Fluoreszenzspektren von G3P* N2-CT nach Denaturierung in 0–6 M Harnstoff dargestellt. In diesem Fall wurde das im Vergleich zu GdmCl schwächere Denaturierungsmittel Harnstoff verwendet, da die N2-Domäne allein sehr instabil ist (R. Jakob, pers. Mitteilung) und bereits bei etwa

2,5 M Harnstoff entfaltet. Die CT-Domäne liegt isoliert ungefaltet vor, deshalb ist ein stabilisierender Effekt auf die N2-Domäne nicht zu erwarten.

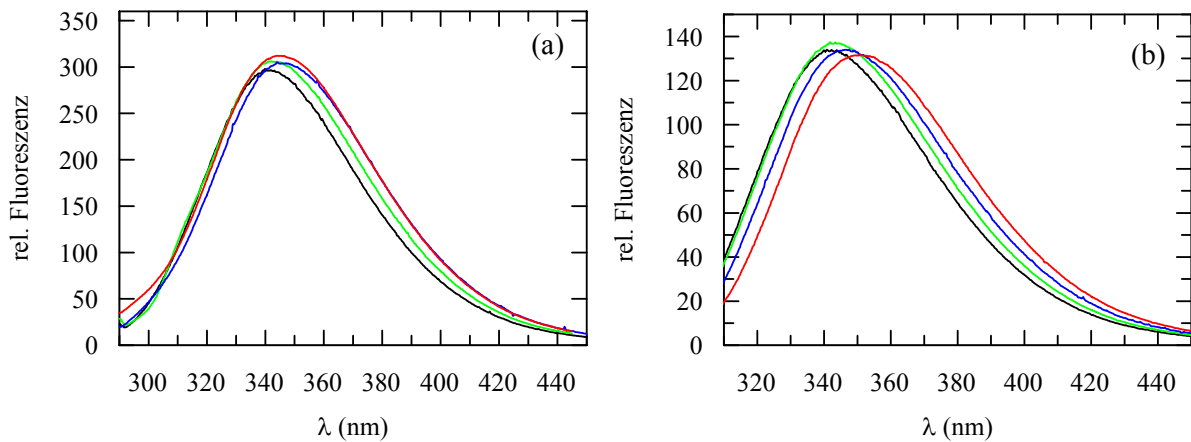


Abbildung 3.48: Fluoreszenzspektren von G3P* N2-CT bei unterschiedlichen Harnstoff-Konzentrationen, 0 M (—), 2 M (—), 4 M (—), 6 M (—). (a) Anregungswellenlänge: 280 nm, (b) Anregungswellenlänge: 295 nm. Die Spektren wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei Bandbreiten von 5 nm (Anregung) bzw. 10 nm (Emission) bei einer Schichtdicke von 10 mm und 25 °C gemessen.

Die Fluoreszenzspektren zeigen nur geringe Änderungen mit zunehmender Harnstoff-Konzentration, wobei sich die Tyrosinfluoreszenz im Bereich von 305 nm nicht ändert. In der CT-Domäne sind sieben, in der N2-Domäne zehn Tyrosinreste lokalisiert. Bei selektiver Anregung des Tryptophanrests ist mit zunehmender Harnstoff-Konzentration eine geringe Verschiebung des Maximums zu höheren Wellenlängen zu erkennen. Die Fluoreszenzspektren lassen daher vermuten, daß N2 im Zweidomänenprotein N2-CT strukturiert vorliegen könnte, allerdings scheint CT auch in diesem Konstrukt unstrukturiert zu sein.

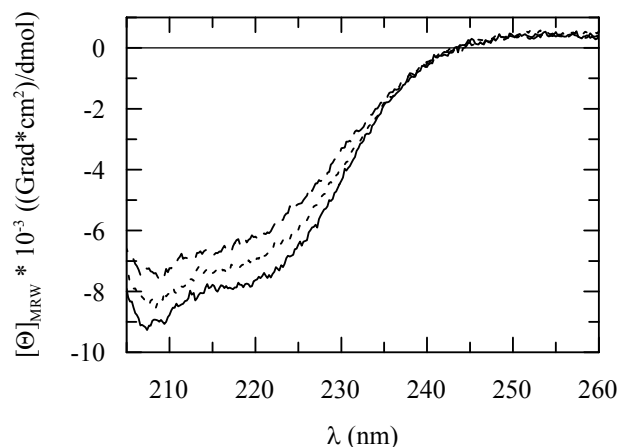


Abbildung 3.49: Fern-UV CD-Spektren von G3P* N2-CT bei verschiedenen Temperaturen, 20 °C (—), 40 °C (····), 60 °C (---). Die Spektren wurden mit 4 μ M Protein in 10 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0, einer Bandbreite von 1 nm, einer Geschwindigkeit von 20 nm/min bei einer Dämpfung von 1 s und einer Schichtdicke von 1 mm gemessen.

Auch in diesem Fall wurde eine Strukturierung des Proteins mittels CD im Fern-UV untersucht (Abbildung 3.49). Wie im Falle der isolierten CT-Domäne liegt auch bei N2-CT ein für α -helikale Proteine typisches Spektrum vor. Das Spektrum wird von der C-terminalen Helix von CT dominiert. In N2 ist nur ein helikaler Bereich vorhanden. Eine Änderung des Signals läßt auf eine Entfaltung dieser Helix in N2 schließen, da die Struktur nicht vollständig verlorengeht und die CT-Helix sehr stabil ist (Abbildung 3.47). Eine Entfaltungsreaktion ist jedoch im thermischen Entfaltungsübergang bei 222 nm nicht zu identifizieren. In diesem Fall aggregiert das Protein oberhalb von 45 °C sehr stark, wodurch lediglich der Beginn der Entfaltung bei etwa 30 °C erkennbar ist. Die starke Aggregationsneigung spricht außerdem für eine große Anzahl hydrophober exponierter Aminosäuren und damit gegen eine definierte Tertiärstruktur des Proteins. Auch das Konstrukt G3P* N2-CT ist bei Raumtemperatur gemäß der Ergebnisse von Proteolyse und Spektren in weiten Teilen unstrukturiert.

3.5.4.3 G3P* N1N2CT

Das Dreidomänenprotein G3P* N1N2CT umfaßt das komplette G3P (Aminosäuren 1-407) mit den stabilisierenden Mutationen T13I, T101I, Q129H und D209Y und einer Verkürzung des *Linkers* zwischen N2 und CT zwischen P230 und D257. Das G3P wurde also so konstruiert, wie es im Phagen zur Selektion verwendet wird. Unter den insgesamt 397 Aminosäuren sind vier Tryptophanreste und 22 Tyrosinreste als chromophore Aminosäuren enthalten. Abbildung 3.50 zeigt Fluoreszenzspektren von G3P* N1N2CT in 0-6 M GdmCl.

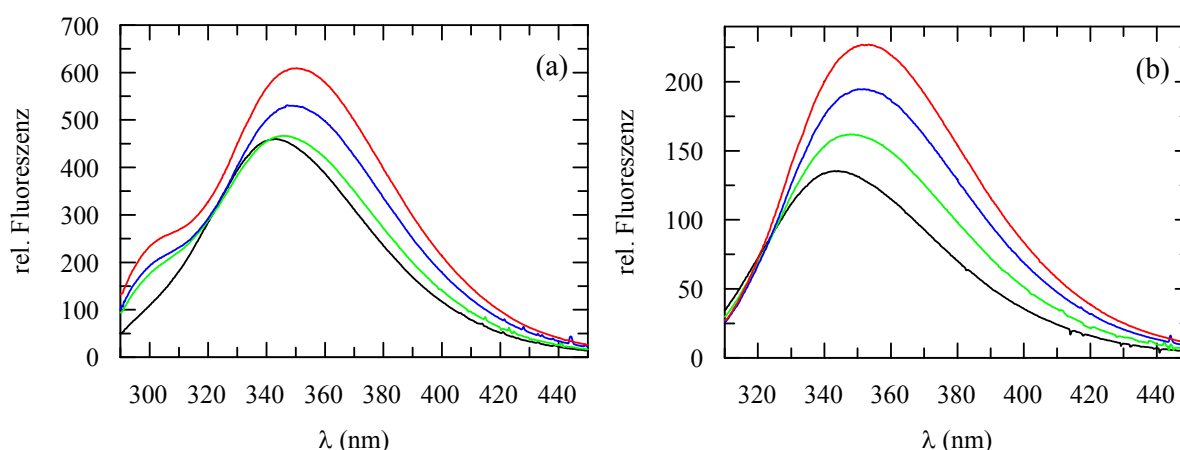


Abbildung 3.50: Fluoreszenzspektren von G3P* N1N2CT bei 0 M (—), 3 M (—), 4 M (—) und 6 M (—) GdmCl. (a) Anregungswellenlänge: 280 nm, (b) Anregungswellenlänge: 295 nm. Die Spektren wurden mit 0,8 μ M Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei Bandbreiten von 5 nm (Anregungsspalt) bzw. 10 nm (Emissionsspalt) bei einer Schichtdicke von 10 mm und 25 °C gemessen.

Sowohl nach Anregung bei 280 nm als auch bei selektiver Anregung der Tryptophanreste bei 295 nm ändert sich das Fluoreszenzspektrum mit zunehmender GdmCl-Konzentration. Im Bereich der Tyrosinfluoreszenz ist bei 3 M GdmCl bereits eine deutliche Änderung erkennbar, bei weiterer Denaturierung verschiebt sich das Maximum zu höheren Wellenlängen und die Fluoreszenz nimmt zu. Hier können zwei getrennte Prozesse

beobachtet werden, wobei eine Zuordnung zur Entfaltung einzelner Domänen zunächst nicht möglich ist (Abbildung 3.50 a). Bei selektiver Anregung der Tryptophanreste sind eine Verschiebung und eine Fluoreszenzzunahme mit zunehmender GdmCl-Konzentration erkennbar. Die Tryptophanfluoreszenz sollte auch in diesem Konstrukt hauptsächlich die Entfaltung der N1-Domäne beschreiben, da N2 nur ein Trp und CT nur Tyrosinreste enthält.

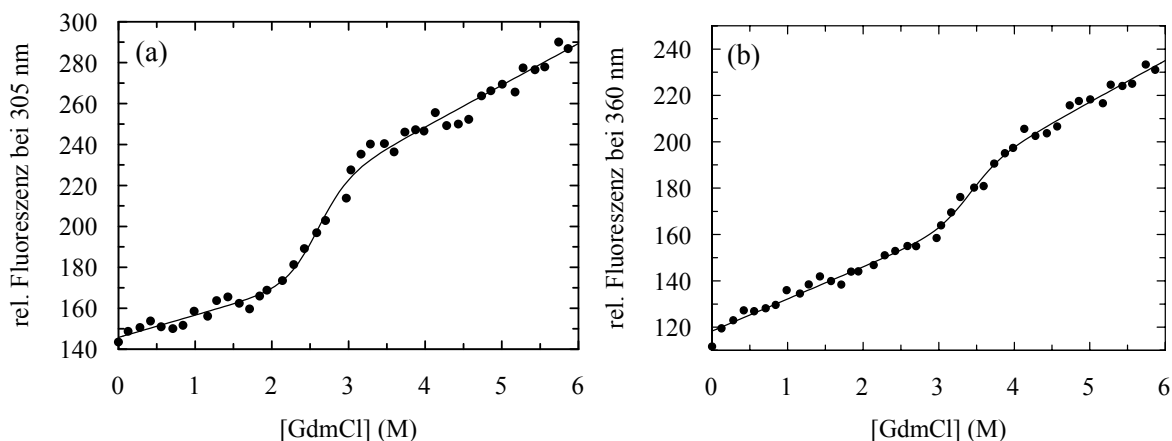


Abbildung 3.51: GdmCl-induzierte Entfaltung von G3P* N1N2CT. (a) Entfaltung beobachtet bei 305 nm nach Anregung bei 280 nm. (b) Entfaltung bei 360 nm nach Anregung bei 295 nm. Die Übergänge wurden mit 0,5 µM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen (Bandbreiten: 3 nm (Anregung), 5 nm (Emission)).

Die Domänen sind in diesem Konstrukt strukturiert, wobei der Beitrag von CT nicht von N1 und N2 getrennt werden kann. Die Stabilität von G3P* N1N2CT gegenüber Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltung entspricht der Stabilität des N1N2-Fragments, wobei die CT-Domäne, wenn überhaupt, nur zur Tyrosinfluoreszenz beitragen sollte. Der Übergang bei 305 nm (Tyrosinfluoreszenz) zeigt einen Mittelpunkt bei 2,8 M GdmCl, der m -Wert beträgt $8,7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ($\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}(\text{H}_2\text{O}) = 24,0 \text{ kJ/mol}$). Im Vergleich zum N1N2-Fragment (Tabelle 3.4) ist die Kooperativität im N1N2CT-Konstrukt deutlich kleiner. Die Ursache hierfür könnte eine zusätzliche Signaländerung durch die Entfaltung der CT-Domäne sein, wobei die Entfaltung von CT den Übergang von N2 beeinflusst, aber nicht als einzelner Übergang erkennbar ist. Der Übergangsmittelpunkt ist im Vergleich zum N1N2-Fragment um 0,3 GdmCl-Einheiten erhöht. Für die Tryptophanfluoreszenz bei 360 nm (nach Anregung bei 295 nm) ergibt sich mit 3,4 M GdmCl etwa der gleiche Übergangsmittelpunkt wie für das N1N2-Fragment. Der Kooperativitätsparameter m ist in diesem Fall mit $11,2 \text{ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ etwas höher als für N1 im N1N2-Fragment bestimmt, jedoch angesichts der geringen Änderung der Fluoreszenz im Rahmen der Meßgenauigkeit. Der Anteil der CT-Domäne ist damit bei der GdmCl-induzierten Entfaltung nicht feststellbar. Die für N2 zu geringe Kooperativität (m -Wert) des Übergangs bei 305 nm kann auf einen Anteil der CT-Entfaltung an der Signaländerung hindeuten.

Um den Beitrag der CT-Domäne zur Stabilität genauer untersuchen zu können, wurde das N1N2CT-Konstrukt mittels Absorptions- und CD-Spektroskopie untersucht. Abbildung 3.52

zeigt Fern-UV CD- bzw. Absorptionsspektren von G3P* N1N2CT bei verschiedenen Temperaturen.

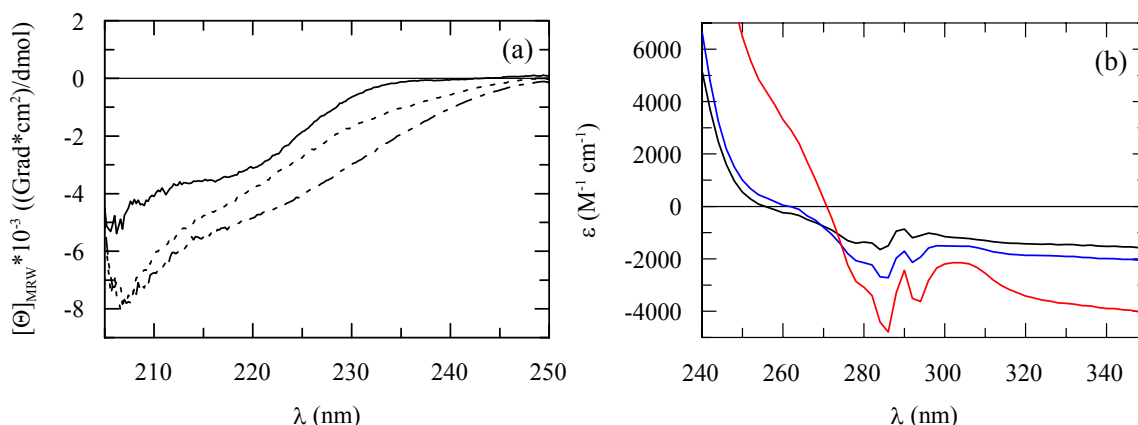


Abbildung 3.52: (a) Fern-UV CD-Spektren von G3P* N1N2CT bei verschiedenen Temperaturen, 20 °C (—), 60 °C (····), 90 °C (---). Die Spektren wurden mit 10 μM Protein in 10 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0, einer Bandbreite von 1 nm, einer Geschwindigkeit von 20 nm/min bei einer Dämpfung von 1 s und einer Schichtdicke von 2 mm gemessen. (b) Differenzabsorptionsspektren zwischen 240 und 350 nm von G3P* N1N2CT, zwischen 25 °C und 49,5 °C (—), 59,5 °C (—), 99 °C (—). Die Spektren wurden mit 7 μM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen.

Die Fern-UV CD-Spektren ändern sich mit zunehmender Temperatur, wobei die Änderung bei 230 nm am größten ist. Bei 210 nm scheint das CD-Signal des denaturierten Proteins bereits bei 60 °C erreicht zu sein, so daß, vergleichbar zum N1N2-Fragment, getrennte Vorgänge bei 210 nm und bei 230 nm beobachtet werden können. Die Zuordnung der Reaktionen zu einzelnen Entfaltungsvorgängen ist jedoch nicht möglich. Die Absorptionsspektren zeigen nur eine geringe Verschiebung des Absorptionsmaximums zu niedrigen Wellenlängen (Blauverschiebung) mit zunehmender Temperatur. Da G3P* N1N2CT vier Tryptophanreste enthält, die deutlich stärker absorbieren als die in größerer Anzahl vorhandenen Tyrosinreste, ist die Änderung der Tyrosinabsorption bei Entfaltung auch im Differenzspektrum nicht groß. Die Differenzspektren zeigen jedoch Minima bei 286 nm und bei 296 nm, die als Meßsonden für die Tyrosinabsorption (286 nm) und die Tryptophanabsorption (296 nm) verwendet werden können. Die höhere Absorption bei 99 °C beruht auf der Verschiebung der Nulllinie des Geräts bei höheren Temperaturen, die im Einstralspektrometer nur für die Ausgangstemperatur bestimmt wird.

Die thermodynamische Stabilität von G3P* N1N2CT wurde durch thermische Entfaltung bestimmt. Den Entfaltungsübergang beobachtet mittels Fern-UV-CD zeigt Abbildung 3.53 a, in Abbildung 3.53 b ist die Entfaltung beobachtet durch Absorption bei 286 nm dargestellt.

Im Fern-UV-CD ist ein komplexer Übergang für das Dreidomänenprotein erkennbar. Im Vergleich zum N1N2-Fragment ist für den ersten Teil des Übergangs eine etwas niedrigere Kooperativität zu erkennen, der Übergang beginnt bei etwa der gleichen Temperatur wie im N1N2-Fragment. Die Daten können nicht gemäß einem Dreizustandsmodell ausgewertet werden. Die Betrachtung der Rohdaten zeigt in diesem Fall, daß die Änderung des CD-

Signals ($[\theta]_{\text{MRW}}$) bei 230 nm für G3P* N1N2CT eine kleinere Amplitude besitzt als für das N1N2-Fragment.

Die Fern-UV CD-Spektren haben ferner gezeigt, daß die erste Reaktion im Entfaltungsprozeß bei 210 nm selektiv betrachtet werden kann. Im N1N2-Fragment entspricht diese Reaktion der Domänen dissoziation und der damit gekoppelten Entfaltung von N2 ($T_m = 61,2^\circ\text{C}$). Für G3P* N1N2CT ergibt sich bei 210 nm ein Übergangsmittelpunkt von $59,3^\circ\text{C}$ (Daten nicht gezeigt). Die Abweichung von 2°C kann wegen des bei 210 nm schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht sicher beurteilt werden.

Thermische Entfaltungsübergänge bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (zwischen $0,5\ \mu\text{M}$ und $4\ \mu\text{M}$) zeigten keinen Unterschied im Beginn des Übergangs. Dies ist ein Hinweis darauf, daß G3P* N1N2CT monomer vorliegt. Eine Oligomerisierung des Proteins wäre in DSC-Messungen anhand des Vergleichs von van't Hoff-Enthalpie und kalorimetrischer Enthalpie erkennbar.

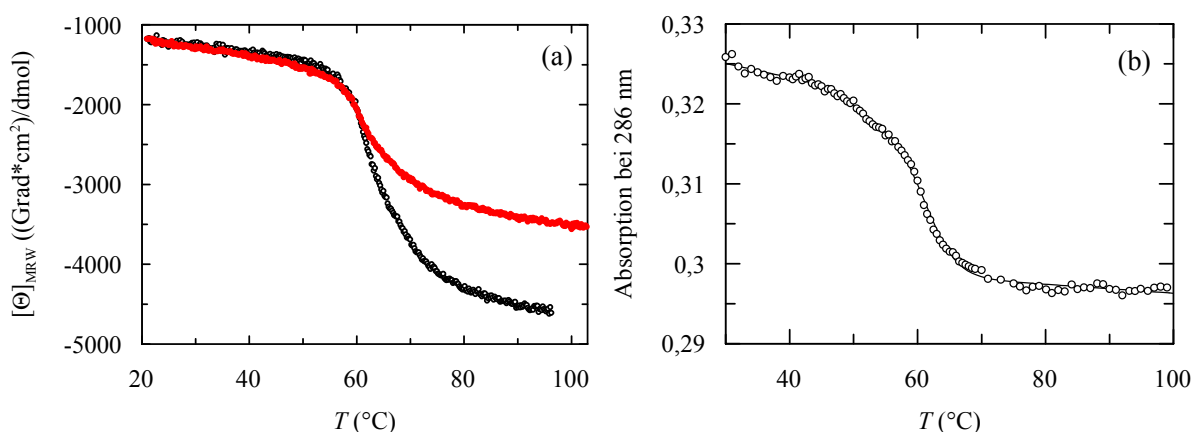


Abbildung 3.53: Thermische Entfaltung von G3P* N1N2CT. (a) Thermische Entfaltung beobachtet mittels Fern-UV-CD bei 230 nm im Vergleich zum N1N2-Fragment G3P* N1N2CT (—), G3P* N1N2 (---). Die Übergänge wurden mit $4\ \mu\text{M}$ Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Dämpfung von 8 s, einer Bandbreite von 1 nm und einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. (b) Thermische Entfaltung von G3P* N1N2CT beobachtet mittels Änderung der Tyrosinabsorption. Der Übergang wurde mit $7\ \mu\text{M}$ Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 und einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die durchgezogene Linie gibt den Angleich an die experimentellen Daten auf der Grundlage eines Dreizustandsmodells an.

Betrachtet man die Absorption bei 286 nm, kann man hauptsächlich den Beitrag der Tyrosinreste beobachten. Da die Tyrosinreste hauptsächlich in N2 (elf) und in CT (sieben) lokalisiert sind, sollte die Tyrosinabsorption als Sonde für diese beiden Domänen Aufschluß über die ersten Entfaltungsreaktionen geben. In Abbildung 3.53 b ist ein zweiphasiger Übergang erkennbar. Die Auswertung des Übergangs gemäß einem Dreizustandsmodell ergibt einen T_m von $49,2^\circ\text{C}$ für die erste Reaktion und einen T_m von $61,1^\circ\text{C}$ für die zweite Reaktion ($\Delta H_D(1) = 495\ \text{kJ/mol}$, $\Delta H_D(2) = 362\ \text{kJ/mol}$). Dieses Ergebnis zeigt, daß der Entfaltung von N2 eine weitere Reaktion vorgelagert ist, die den Unterschied der CD-Daten erklären könnte.

DSC-Messungen zur Entfaltung von G3P* N1N2CT (Abbildung 3.53) zeigen einen Übergangsmittelpunkt T_m von $61,2^\circ\text{C}$ für N2, der gut mit den Absorptionsdaten

übereinstimmt. Der Angleich an die erhaltenen Meßdaten zeigt eine Asymmetrie des Peaks, ein Beitrag der CT-Domäne kann jedoch nicht identifiziert werden. Aufgrund der geringen Konzentration von 26 μM Protein bei dieser Messung ist die Bestimmung der Basislinien sehr ungenau. Die Entfaltung von N1 ist hier vermutlich aufgrund der niedrigen Kooperativität des Übergangs nicht zu erkennen. Geht man von einer nur teilweise strukturierten CT-Domäne aus, so könnte ebenfalls eine sehr geringe Enthalpieänderung die Identifizierung erschweren. Insgesamt kann anhand der Stabilitätsuntersuchungen ein Beitrag von CT zur Stabilität vermutet werden, eindeutig zu bestimmen ist dieser jedoch nicht.

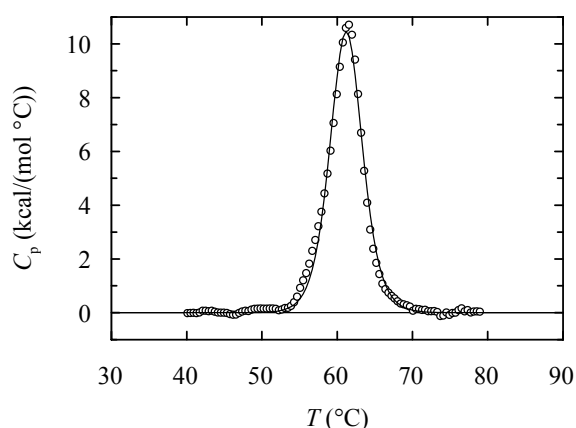


Abbildung 3.54: DSC-Messung von G3P* N1N2CT. Die Messung wurde mit 26 μM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Heizrate von 90 K/h durchgeführt. Die durchgezogene Linie gibt das Ergebnis der Levenberg-Marquardt-Analyse nach dem Nicht-Zweizustandsmodell wieder.

3.5.5 Fazit der Charakterisierung der G3P*-CT-Konstrukte

Die Expression der CT-Domäne des G3P* in Abwesenheit der vorhergesagten hydrophoben C-terminalen Helix resultiert sowohl bei isolierter CT-Domäne als auch im Dreidomänenprotein in einer weitgehend unstrukturierten Polypeptidkette. Bei Expression der vollständigen isolierten Domäne ist eine Reststruktur anhand spektroskopischer Methoden nachweisbar. Hier kann anhand CD-Spektroskopie ein ausgeprägtes α -helikales Signal beobachtet werden. Da sich das Fern-UV-CD-Signal mit zunehmender Temperatur jedoch nicht ändert, ist davon auszugehen, daß hier lediglich die C-terminale Helix strukturiert vorliegt und ein charakteristisches Signal liefert, der Rest des Moleküls jedoch unstrukturiert ist. Dieses Verhalten ist auch für das Konstrukt G3P* N2-CT erkennbar. Proteolyse mit Chymotrypsin bestätigt diese Ergebnisse. Nur im Dreidomänenprotein N1N2CT ist die CT-Domäne eine gewisse Zeit proteaseresistent und scheint strukturiert vorzuliegen. Der genaue Beitrag ist dabei nicht eindeutig feststellbar. Verfolgt man die thermische Entfaltung mittels Absorption bei 286 nm, also im Absorptionsbereich der in der CT-Domäne in großer Anzahl vorkommenden Tyrosinreste, läßt sich ein Beitrag der Entfaltung der CT-Domäne vermuten. Bei thermischer Entfaltung mittels DSC und Beobachtung durch CD-Spektroskopie sind deutliche Abweichungen vom Verhalten des N1N2-Fragments feststellbar. Diese Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen lassen darauf schließen, daß eine korrekte Faltung der CT-

Domäne nur im Zusammenhang mit einer Membran bzw. hydrophoben Bereichen möglich ist. Diese Annahme würde der Funktion der CT-Domäne bei Infektion und Phagenabschnürung entsprechen. In beiden Fällen muß die Polypeptidkette eine hohe Flexibilität besitzen, da sie Konformationsänderungen ausgesetzt ist. Als *Linker* muß CT das N1N2-Fragment zum sekundären Rezeptor TolA transportieren und mit der C-terminalen Helix das G3P in der Wirtszellmembran verankern (Rakonjac *et al.*, 1999). Nicht auszuschließen ist bei den bisherigen Untersuchungen der G3P*-CT-Konstrukte, daß der verkürzte *Linker* zwischen N2 und CT-Domäne für die korrekte Faltung der CT-Domäne problematisch ist. Hier wären als weitere Experimente die Expression und Charakterisierung des Wildtyp-N1N2CT-Proteins denkbar. Alle bisherigen Untersuchungen basieren auf dem bereits stabilisierten G3P*. Bei Betrachtung des Wildtyp-Proteins könnte der größere Stabilitätsunterschied zwischen N1 und N2 eine deutlichere Beurteilung eines möglichen Beitrags von CT ermöglichen. Um die Wechselwirkungen der Domänen untereinander bestimmen zu können, wäre die Kristallstruktur dieses Dreidomänenproteins von großem Interesse. Außerdem wären zusätzliche Sonden in der CT-Domäne, z. B. für Energietransfer-Messungen, sehr wichtig, um diese vorläufigen Daten validieren zu können.

3.6 Stabilisierung von TEM-1 β -Lactamase durch *in vitro*-Evolution

3.6.1 Selektionsstrategie

Während in den vorhergehenden Selektionen das G3P des Phagen stabilisiert wurde, sollte am Beispiel von TEM-1 β -Lactamase (β -La) das *Proside*-Selektionssystem für die evolutive Stabilisierung eines großen Gastproteins verwendet werden. In früheren *Proside*-Selektionen in der Arbeitsgruppe konnte bereits die Anwendbarkeit des Systems für kleine Proteine mit weniger als 70 Aminosäuren gezeigt werden (Martin *et al.*, 2001; Wunderlich *et al.*, 2005a; Wunderlich *et al.*, 2005b; Wunderlich und Schmid, 2006). Mit der β -Lactamase (β -La) sollte nun ein deutlich größeres Protein (263 Aminosäuren) mit der *Proside*-Methode stabilisiert werden, wobei die Enzymaktivität erhalten bleiben sollte. β -Lactamasen spalten den β -Lactamring entsprechender Antibiotika. β -Lactamase ist ein monomeres Protein aus zwei Domänen, wobei das aktive Zentrum an der Domänengrenzfläche lokalisiert ist (Frère, 1995). Das Verständnis von Stabilität und Aktivität dieses Enzyms ist von großem Interesse und hat zu intensiver Forschung über viele Jahre hinweg geführt.

In dieser Arbeit wurde die TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli* zwischen die N2- und die CT-Domäne des G3P als Gastprotein eingebaut. Die Stabilisierung wurde in diesem Fall durch eine *Proside*-Selektion in mehreren Schritten erreicht. Zunächst wurde dabei das Wildtyp-Protein durch Zufallsmutagenese gefolgt von *Proside*-Selektion stabilisiert. Um einen größeren Spielraum für zusätzliche Mutationen zu erhalten, wurde die β -Lactamase durch Ersatz der Disulfidbrücke destabilisiert und dann einer erneuten Zufallsmutagenese unterworfen. Die Infektiosität der Phagen konnte durch den Ersatz der Disulfidbrücke um eine Zehnerpotenz gegenüber Phagen mit disulfidverbrückter Wildtyp- β -Lactamase erhöht werden. Sättigungsmutagenese an den für die Stabilität besonders wichtigen Positionen 182 und 224 lieferte hierfür die beste Aminosäurekombination, und eine letzte Selektion in Gegenwart von GdmCl ermöglichte die Identifizierung zusätzlicher Mutationen.

3.6.2 Zufallsmutagenese und thermische Selektion von Wildtyp- β -Lactamase

Zunächst wurden durch fehlerbehaftete PCR vier unabhängige Genbibliotheken der β -Lactamase erstellt. Die folgende *Proside*-Selektion bei zunehmender Temperatur (thermische Selektion) von 40 °C bis 45 °C ermöglichte die Identifizierung von fünf verschiedenen Varianten (A1-A5), die mit unterschiedlicher Häufigkeit auftraten (Tabelle 3.17). Zusätzlich wurden in den selektierten Varianten zwei stille Mutationen an den Positionen 73 und 263 identifiziert. Von den bei sehr niedrigem Selektionsdruck identifizierten Varianten A1-A5 dominierte mit zunehmender Temperatur die Variante β -La M182T die Selektion. Diese Mutation wurde am häufigsten in allen Bibliotheken gefunden. M182T ist eine bereits bekannte Mutation, die auch in den natürlichen β -Lactamasen TEM-32 und TEM-43 vorkommt (Palzkill, 1997; Petrosino *et al.*, 1998). Als sogenannte globale Suppressor-Mutation tritt M182T in Kombination mit Mutationen auf, welche die Faltung und / oder die

Stabilität der β -Lactamase beeinträchtigen. Damit ermöglicht sie einen größeren Spielraum für Mutationen an anderen Positionen und eine größere evolutive Flexibilität (Sideraki *et al.*, 2001). Die zweite auffällige Mutation aus dieser ersten Selektion ist A224V. Diese Mutation tritt zum einen als Einzelmutation, zum anderen in Kombination mit der Mutation I208M auf.

Tabelle 3.17: Varianten aus der β -La -Zufallsmutagenese.

Position	β -La	Variante											
		A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	C1	D1	D2
27	Pro		Ser										
62	Pro								Ser				
80	Val								Ile	Ile			
118	Thr									Ile			
146	Lys						Arg				Arg		
147	Glu											Gly	
182	Met	Thr		Thr			Thr	Thr	Thr	Thr	Thr		
201	Leu								Pro	Pro			Pro
208	Ile					Met							
223	Ser			Trp									
224	Ala				Val	Val		Thr					
240	Glu												His
247	Ile								Val				
275	Arg										Leu		

Die Varianten A1-A5 wurden durch Zufallsmutagenese der Wildtyp- β -Lactamase erhalten. Hier wurden vier unabhängige Bibliotheken durch fehlerbehaftete PCR erstellt und einer *Proside*-Selektion unterworfen. Die Varianten A1 (2 x selektiert), A2 (1 x selektiert) und A3 (1 x selektiert) konnten in Bibliothek 1 identifiziert werden; Varianten A4 (1 x) und A5 (4 x) stammen aus Bibliothek 2 dieser Selektion. Die Varianten B1-B4 wurden in der Zufallsmutagenese und Selektion der β -Lactamase ohne Disulfidbrücke identifiziert. Die Varianten stammen aus zwei unabhängigen Bibliotheken. Variante B1 konnte 3 x identifiziert werden, Variante B2 in der gleichen Bibliothek 1 x. Varianten B3 (3 x selektiert) und B4 (1 x selektiert) stammen aus Bibliothek 4. Varianten Ax und Bx wurden in einer thermischen *Proside*-Selektion identifiziert. Varianten Cx und Dx wurden durch eine Selektion in Gegenwart steigender Konzentrationen an GdmCl selektiert. Dabei wurde Variante C1 in einer Bibliothek identifiziert, die durch fehlerbehaftete PCR aus der Variante β -La K146R/M182T erstellt wurde (2 x selektiert). Die Varianten D1 und D2 stammen ebenfalls aus einer GdmCl-Selektion, für die Selektionen wurden hier jedoch die Startbibliotheken aus der thermischen Selektion verwendet. Beide Varianten wurden 3 x identifiziert.

Die β -La-Varianten wurden durch thermische Denaturierung charakterisiert. Dabei wurden sowohl die Varianten aus der Selektion als auch die Einzelvarianten überexprimiert und bezüglich ihrer thermodynamischen Stabilität analysiert. Die thermischen Entfaltungsübergänge der wichtigsten selektierten Varianten sind in Abbildung 3.55 a dargestellt, die zugehörigen T_m -Werte für alle Einzel- und Kombinationsvarianten faßt Tabelle 3.18 zusammen. Die thermische Entfaltung der beiden Domänen der β -Lactamase ist nicht getrennt beobachtbar. Stattdessen repräsentiert der hochkooperative Übergang die Entfaltung beider Domänen. Obwohl die thermischen Entfaltungsübergänge zwei ineinandergreifende Übergänge repräsentieren, wurden sie gemäß einem Zweizustandsmodell analysiert. Im Vergleich zum

Wildtyp-Protein ist die Variante I208M / A224V deutlich stabilisiert ($\Delta T_m = 3,5$ °C). Der Beitrag der Mutation A224V kann aus der Einzelvariante zu $\Delta T_m = 3,1$ °C bestimmt werden. Am stabilsten gegenüber thermischer Entfaltung ist die Variante β -La M182T mit einem Schmelzpunkt von 56,5 °C, also einem ΔT_m von 5,7 °C.

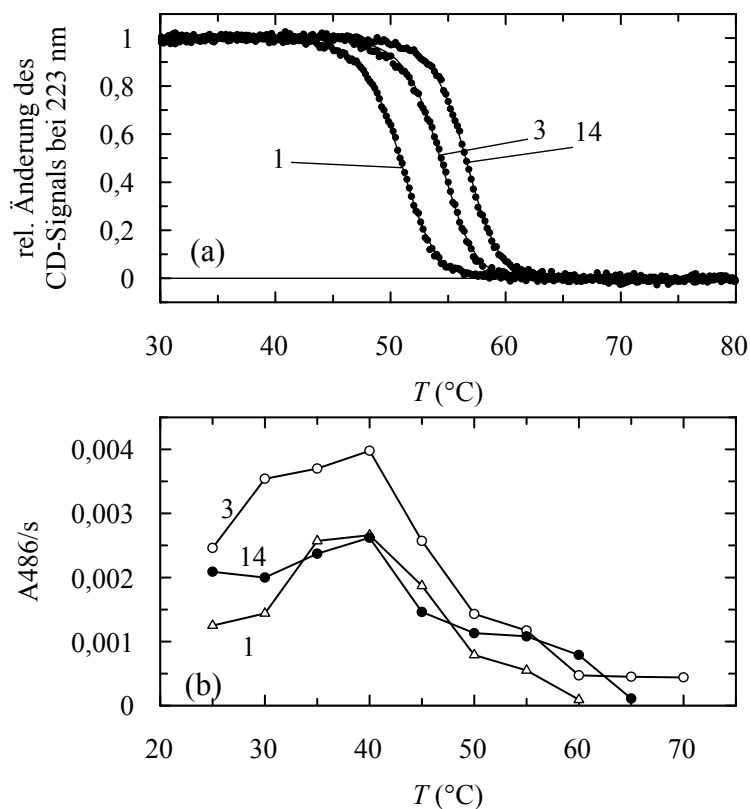


Abbildung 3.55: Charakterisierung der Varianten aus der Zufallsmutagenese von β -La Wildtyp. (a) Thermische Entfaltung der β -La-Varianten. β -La Wildtyp (1), β -La I208M/A224V (3) und β -La M182T (14). Die relative Signaländerung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm und einer Heizrate von 60 K/h gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.18 aufgeführt. (b) Temperaturabhängige Aktivität der β -La -Varianten. Gezeigt sind die Temperaturprofile von β -La Wildtyp (1, Δ), β -La I208M/A224V (3, \circ) und β -La M182T (14, \bullet). Dargestellt ist die Absorptionsänderung bei 486 nm bei Spaltung des chromogenen Substrats Nitrocefin. Die Aktivitäten wurden mit 2,5 nM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7,0 mit 20 μ M Nitrocefin bei verschiedenen Temperaturen gemessen.

Bei Betrachtung der Einzelvarianten fällt auf, daß die Varianten P27S und S223W einen niedrigeren Schmelzpunkt als das Wildtyp-Protein besitzen. Diese Varianten wurden bei einem sehr niedrigen Selektionsdruck identifiziert. Bei 45 °C, d.h. noch unter dem Schmelzpunkt des Wildtyp-Proteins wurden aus entsprechenden Bibliotheken Einzelklone getestet, um eine Diversität der Bibliotheken zeigen zu können. In diesem Stadium der Selektion war noch nicht davon auszugehen, daß die identifizierten Varianten deutlich stabiler als das Wildtyp-Protein sind. In den folgenden Selektionsrunden wurden diese wenig stabilen Varianten vollständig aus der Bibliothek verdrängt, womit eine erfolgreiche Anwendung der *Proside*-Methode bestätigt wird. Die Selektion der stark stabilisierten Variante M182T in

beiden Bibliotheken zeigt die Effektivität von *Prosicle*, auch in der Anwendung auf große Proteine. Die Beiträge der meisten selektierten Mutationen sind jedoch gering, wenn man nur die Schmelzpunkte der Proteine vergleicht. Da es sich jedoch um einen hochkooperativen Übergang eines Zweidomänenproteins handelt, ist die freie Enthalpie der Entfaltung sehr hoch. Die Entfaltungsübergänge wurden gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet. Dies ist eine Vereinfachung des Faltungsmechanismus, und deshalb sind die angegebenen thermodynamischen Daten eher qualitative Daten zum Vergleich der Varianten untereinander. Zur Beurteilung der Funktionalität der selektierten Varianten wurden temperaturabhängig die Aktivitäten aller Varianten anhand der Spaltung des Substrats Nitrocefin gemessen (Abbildung 3.55 b). Nitrocefin ist ein chromogenes Cephalosporin-Derivat, das bei Spaltung seine Farbe ändert (O'Callaghan *et al.*, 1972). Die β -Lactamase-Aktivität wurde bei der Wellenlänge des Maximums im Differenzspektrum zwischen gespaltenem und ungespaltenem Substrat, 486 nm, gemessen. Die temperaturabhängigen Aktivitätsprofile der verschiedenen Varianten unterscheiden sich in der Lage des Aktivitätsmaximums, jedoch bleibt die Aktivität bei 25 °C nahezu unverändert. Die thermischen Stabilitäten der verschiedenen β -La-Varianten und ihre Aktivitäten bei 25 °C sind in Tabelle 3.18 zusammengestellt. Die Stabilitäten der selektierten Varianten wurden zusätzlich zur thermischen Entfaltung auch durch Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung charakterisiert (Abbildung 3.56).

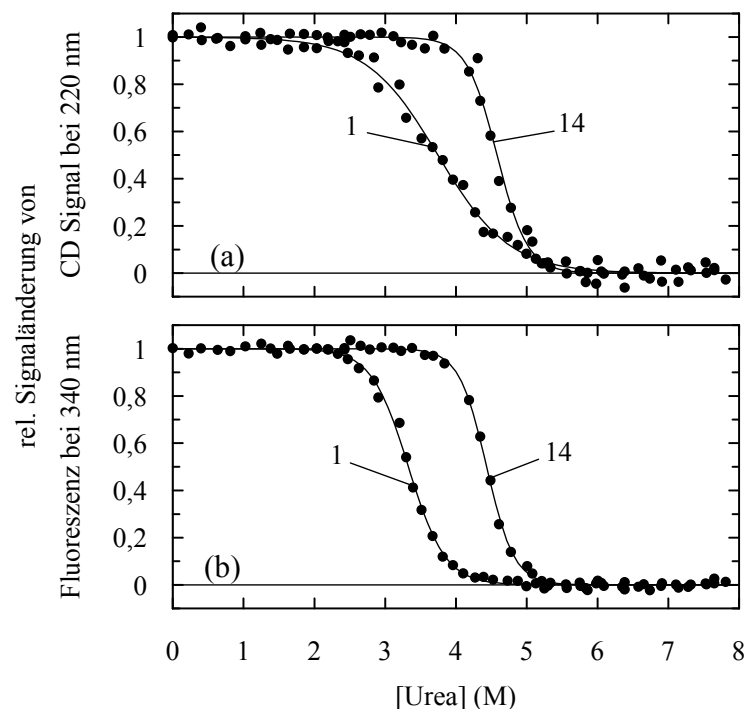


Abbildung 3.56: Harnstoff-induzierte Entfaltung der Varianten aus der Zufallsmutagenese β -La-Wildtyp, beobachtet mittels CD bei 220 nm (a) bzw. Fluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm (b). Gezeigt sind die Übergänge von β -La-Wildtyp (1) und β -La M182T (14). Die Übergänge wurden mit 0,35 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C in einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Dargestellt sind die relativen Signaländerungen von CD bzw. Fluoreszenz nach Auswertung der Daten gemäß einem Zweizustandsmodell in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration. Die Stabilitätsdaten aus der Zweizustandsanalyse sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.

Die Entfaltung wurde in diesem Fall durch Harnstoff induziert und mittels zwei verschiedener Sonden beobachtet, CD und Fluoreszenz. Die Entfaltung der β -Lactamase durch Harnstoff ist ein zweiphasiger Prozeß (Vanhove *et al.*, 1995a). Der Fern-UV-CD ist eine Sonde für Sekundärstrukturänderungen, die Fluoreszenz verfolgt Änderungen in der Orientierung aromatischer Reste und registriert damit vor allem Tertiärstrukturänderungen. Verfolgt man die Entfaltungsreaktion anhand des CD-Signals bei 220 nm, so sind beide Entfaltungsreaktionen sichtbar. Bei Beobachtung der Fluoreszenzänderung bei der Entfaltung kann hingegen nur die erste Reaktion detektiert werden. Die Reaktionen im zweiphasigen Übergang sind dabei nicht der Entfaltung der einzelnen Domänen zuzuordnen. Stattdessen resultiert die erste Reaktion in einem Intermediat, das gemäß den CD-Daten noch signifikante Sekundärstruktur aufweist, gemäß den Fluoreszenz-Daten jedoch keine hochgeordnete Tertiärstruktur mehr besitzt. Es handelt sich vermutlich um einen *molten globule*-ähnlichen Zustand (Vanhove *et al.*, 1995a). Der Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergang für die Variante M182T aus der ersten Selektion ist in Abbildung 3.56 a/b dargestellt, und die Ergebnisse der Entfaltung aller β -La-Varianten sind in Tabelle 3.19 aufgeführt. Die Ergebnisse der Harnstoff-induzierten Entfaltung bestätigen die Ergebnisse der thermischen Entfaltung. Für β -La M182T (Variante 14), die stabilste Variante aus der thermischen Selektion, ist der erste Übergang vom nativen Zustand zum Intermediat besonders stark verschoben. Dies bestätigen sowohl die CD- als auch die Fluoreszenz-Daten. Die Ergebnisse zeigen ein generelles Prinzip der *Proside*-Methode, nämlich die Stabilisierung des schwächsten Glieds im Protein, in diesem Fall also die Stabilisierung des nativen Proteins relativ zum Intermediat.

Tabelle 3.18: Stabilitäts- und Aktivitätsdaten für das β -La Wildtyp-Protein, alle selektierten Varianten und alle konstruierten Einzelvarianten.

Sel.	Nr.	β -La-Variante	T_m (°C)	$\Delta G_D(50^\circ)$ (kJ/mol)	Aktivität A486 /s bei 25 °C
	1	WT	50,8	1,39	0,00125
	2	C77A C123A	48,5	-1,94	0,00023
A5	3	I208M/A224V	54,3	6,97	0,00246
B4	4	V80I/T118I/M182T/L201P	53,0	3,59	0,00052
B3	5	P62S/V80I/M182T/L201P/I247V	59,3	14,65	0,00082
B1	6	K146R/M182T	55,6	10,13	0,00137
C1	7	K146R/M182T/R275L	60,4	16,21	0,00114
	8	L201P	52,2	3,34	0,00105
	9	P62S	51,8	3,16	0,00115
	10	I247V	51,2	2,04	0,00207
	11	V80I	51,6	2,67	0,00148
	12	A224T	50,3	0,41	0,00172
	13	I208M	51,8	3,11	0,00190
A1	14	M182T	56,5	10,37	0,00209
A4	15	A224V	53,9	6,37	0,00114
	16	K146R	50,5	0,80	0,00230
	17	M182T/A224V	58,4	13,29	0,00309
	18	E240H	51,1	1,90	0,00105
D1	19	E147G	53,2	6,00	0,00204
	20	R275L	55,8	9,27	0,00178
A2	21	P27S	48,8	-2,05	n.b.
	22	S223W	48,4	-2,61	n.b.
	23	P62S/V80I/M182T/L201P/I247V E147G/I208M/A224V/R275L	69,2	28,57	0,07015

Für alle Varianten sind die Schmelztemperaturen T_m und die freie Enthalpie der Entfaltung bei 50 °C ($\Delta G_D(50^\circ\text{C})$) angegeben. Die thermodynamischen Parameter wurden aus thermischen Entfaltungübergängen, verfolgt mittels Fern-UV-CD bei 223 nm, erhalten. Die Daten wurden gemäß einem Zweizustandsmodell ausgewertet, wobei die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p auf 30 000 J mol⁻¹ K⁻¹ festgelegt wurde. Die Aktivitäten wurden unter den in Abbildung 3.55 b beschriebenen Bedingungen gemessen. Angegeben sind die Anfangssteigungen der Spaltungsreaktionen bei 25 °C. Die erste Spalte gibt die Bezeichnung der Varianten aus der Selektion an, die zweite Spalte enthält Identifikationsnummern für alle Varianten, die auch in den weiteren Abbildungen und Tabellen verwendet werden.

Tabelle 3.19: Stabilitätsdaten aus den Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen der β -La-Varianten.

Nr.	β -La-Variante	CD (220 nm)			Fluoreszenz (ex 280 nm/em 340 nm)		
		m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	[Urea] $_{1/2}$ (M)	m	$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	[Urea] $_{1/2}$ (M)
1	WT	4,9	18,4	3,7	9,5	31,7	3,3
2	C77A C123A	7,4	19,7	2,7	9,7	25,2	2,6
4	V80I/T118I/M182T/ L201P	8,4	30,6	3,7	7,0	26,0	3,7
5	P62S/V80I/M182T/ L201P/I247V	10,8	48,6	4,5	10,6	49,0	4,6
6	K146R/M182T	10,5	45,8	4,4	10,1	43,3	4,3
8	L201P	7,9	25,7	3,3	3,9	15,2	3,9
14	M182T	11,6	53,1	4,6	12,7	56,4	4,5
17	M182T/A224V	12,0	57,8	4,8	11,8	56,5	4,8

Angegeben sind der Kooperativitätsparameter m in $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$, $\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ in Abwesenheit des Denaturierungsmittels in kJ/mol und die Denaturierungsmittelkonzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{Urea}]_{1/2}$ in M. Die Übergänge wurden dabei mittels CD bei 220 nm und mittels Fluoreszenz bei 340 nm verfolgt. Die experimentellen Daten wurden gemäß einem Zweizustandsmodell angeglichen. Die angegebenen thermodynamischen Daten sind daher nur qualitativ zu beurteilen, um die Varianten vergleichen zu können.

3.6.3 Zufallsmutagenese und thermische Selektion der disulfidfreien β -Lactamase

Das Selektionssystem ist zum einen limitiert durch die Stabilität des G3P, zum anderen durch die Stabilität der verwendeten Protease, in diesem Fall Chymotrypsin. Der für die Selektion verwendete Phage verfügt bereits über ein stabilisiertes G3P (G3P*, vier stabilisierende Mutationen), das bis 60 °C stabil ist (Übergangsmittelpunkt der N2-Domäne), und die verwendete Protease Chymotrypsin kann bis etwa 57 °C verwendet werden. β -La mit der Mutation M182T hat einen Übergangsmittelpunkt von 56,5 °C. Damit wird die Grenze des Selektionssystems bereits mit dieser Einzelmutation erreicht. Dies wird auch bei Betrachtung der zugehörigen Proteasestabilitäten von Phagen mit β -La Wildtyp bzw. der M182T-Variante als Gastprotein in Abbildung 3.57 deutlich.

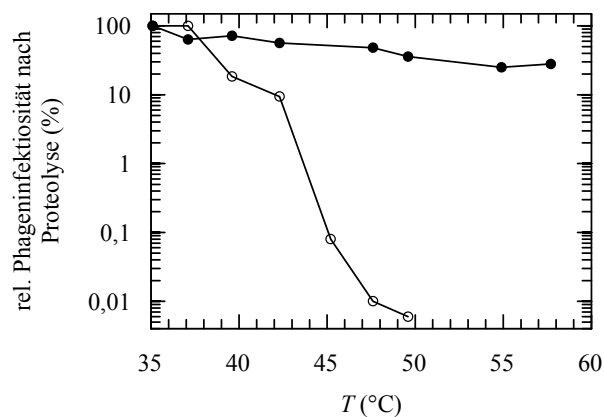


Abbildung 3.57: Proteasestabilität nach Proteolyse von Phagen mit β -La Wildtyp (○) und β -La M182T (●) als Gastprotein. Dargestellt sind die relativen Infektiositäten nach 15minütiger Proteolyse mit etwa 10^9 Phagen in 100 mM Kalium-Phosphat, 100 μM CaCl_2 (pH 8,0) mit 0,25 μM Chymotrypsin. Die Infektiosität nach der Inkubation eines Kontrollansatzes bei der gleichen Temperatur wurde gleich 100 % gesetzt.

Während Phagen mit β -La Wildtyp nur bis etwa 40 °C proteasestabil sind, ist bei Phagen mit β -La M182T bereits das Selektionslimit erreicht, da diese Phagen bis 55 °C proteaseresistent sind. Um einen größeren Spielraum für weitere Mutationen zu erhalten, wurde das Protein durch den Ersatz der Disulfidbrücke C77-C123 durch zwei Alanine destabilisiert (Vanhove *et al.*, 1997). Die Harnstoff-induzierte Entfaltung der disulfidfreien β -Lactamase im Vergleich zum Wildtyp-Protein ist in Abbildung 3.58 dargestellt.

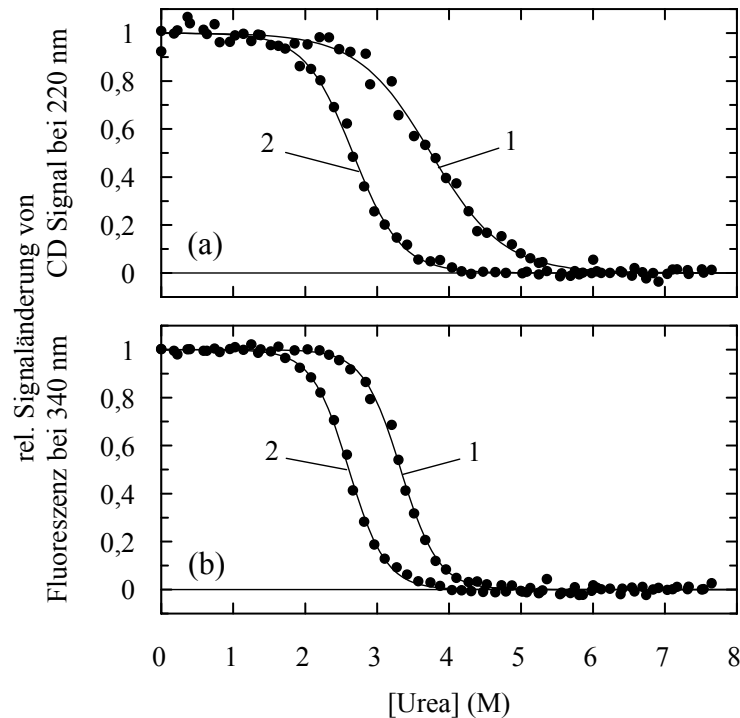


Abbildung 3.58: Harnstoff-induzierte Entfaltung von β -Lactamase-Wildtyp (1) bzw. der disulfidfreien Variante C77A/C123A (2) beobachtet mittels CD bei 220 nm (a) bzw. Fluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm (b). Die Übergänge wurden mit 0,35 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Dargestellt sind die relativen Signaländerungen von CD bzw. Fluoreszenz nach Auswertung der Daten gemäß einem Zweizustandsmodell in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration. Die Stabilitätsdaten aus der Zweizustandsanalyse sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.

Die Harnstoff-induzierte Entfaltung zeigt die Destabilisierung der disulfidfreien β -Lactamase (CD-Daten) in den beiden Entfaltungsreaktionen, wobei die zweite Reaktion (Entfaltung des Intermediats zum entfalteten Protein) stärker betroffen ist als die erste. Die Fluoreszenz-Daten bestätigen das Ergebnis für die erste Reaktion, und auch die thermische Entfaltung (Daten nicht gezeigt) zeigt die Destabilisierung der disulfidfreien Variante. Aufgrund der hohen Kooperativität des Übergangs und der kooperativen Einheit aus beiden Domänen gibt der Schmelzpunkt in diesem Fall nur einen Anhaltspunkt, die freie Enthalpie der Entfaltung ist in diesem Fall deutlich niedriger, die Aktivität der disulfidfreien Variante ist ebenfalls niedriger als die des Wildtyp-Proteins. Die thermodynamischen Daten und die enzymatischen Aktivitäten sind in Tabelle 3.18 aufgeführt.

Ausgehend von der disulfidfreien β -Lactamase wurden zwei unabhängige Bibliotheken mittels fehlerbehafteter PCR erstellt. In der anschließenden thermischen *Proside*-Selektion

wurde innerhalb von 11 Selektionsrunden die Temperatur von 40 °C auf 50 °C erhöht. Die Selektion wurde in Gegenwart von lediglich 20 µg/ml Ampicillin durchgeführt, da *E. coli*-Zellen mit der β -Lactamase ohne Disulfidbrücke in Gegenwart von 300 µg/ml Ampicillin nicht mehr wachsen. In den zwei Bibliotheken konnten vier verschiedene Varianten identifiziert werden, die in Tabelle 3.17 als Varianten B1-B4 aufgeführt sind. Die Mutation M182T erscheint erneut in beiden Bibliotheken und auch in allen selektierten Varianten. In diesem Fall ist die Mutation jedoch mit einer Vielzahl weiterer Mutationen kombiniert. Dabei tritt zum einen die Position 224 wieder auf, diesmal jedoch mit einer Mutation zum Threonin. Neben der Doppelvariante M182T / K146R konnten noch eine Vierfach- und eine Fünffachvariante identifiziert werden. Auffällig ist dabei zum einen die Mutation L201P, die in den Varianten B3 und B4 auftritt, zum anderen der Austausch von Pro zu Ser an Position 62.

Um den Vergleich mit den vorherigen Varianten zu ermöglichen und den stabilisierenden Effekt der Mutationen auf das Wildtyp-Protein untersuchen zu können, wurde die thermodynamische Stabilität der Varianten im disulfidverbrückten Protein untersucht. Die Selektion wurde hingegen im disulfidfreien Protein durchgeführt. Die thermischen Entfaltungsübergänge der gereinigten Proteine sind in Abbildung 3.59 a dargestellt. Die thermische Entfaltung zeigt, daß alle selektierten Varianten stark stabilisiert sind, wobei die Fünffach-Variante P62S / V80I / M182T / L201P / I247V mit einem Übergangsmittelpunkt von $T_m = 59,3$ °C am stabilsten ist. Alle selektierten Varianten zeigen β -La-Aktivität, eine Folge der Selektion in Gegenwart von Ampicillin. Abbildung 3.59 b zeigt für die Variante V80I / T118I / M182T / L201P die geringste Aktivität, die Fünffachvariante zeigt hingegen eine Verschiebung des Optimums der Aktivität zu höheren Temperaturen. Die Aktivitätsmessungen mit Nitrocefin wurden nicht unter Substratsättigung durchgeführt und sind deshalb nur qualitativ zu bewerten.

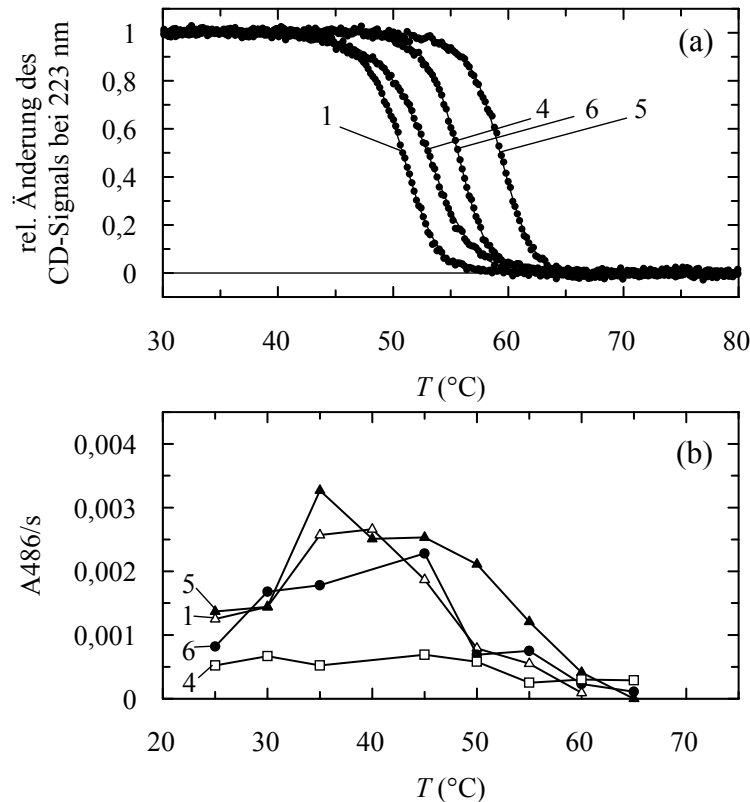


Abbildung 3.59: Charakterisierung der Varianten aus der Zufallsmutagenese β -La C77A/C123A. (a) Thermische Entfaltung der β -La-Varianten in Gegenwart der C77-C123 Disulfidbrücke. Dargestellt sind β -La Wildtyp (1), β -La V80I/T118I/M182T/L201P (4), β -La K146R/M182T (6) und β -La P62S/V80I/M182T/L201P/I247V (5). Die relative Signaländerung des CD nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden unter den in Abbildung 3.55 angegebenen Bedingungen gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.18 aufgeführt. (b) Temperaturabhängige Aktivität der β -La-Varianten. Gezeigt sind die Temperaturprofile von β -La Wildtyp (1, Δ), β -La V80I/T118I/M182T/L201P (4, \square), β -La K146R/M182T (6, \bullet) und β -La P62S/V80I/M182T/L201P/I247V (5, \blacktriangle). Gezeigt ist die Absorptionsänderung bei 486 nm/s bei Spaltung des chromogenen Substrats Nitrocefin in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Aktivitäten wurden unter den in Abbildung 3.55 angegebenen Bedingungen gemessen.

Auch für diese Varianten wurde die Stabilität gegenüber Harnstoff untersucht, um den stabilisierenden Einfluß der Mutationen auf die beiden Entfaltungsreaktionen bestimmen zu können (siehe Abbildung 3.60). Die Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge bestätigen auch bei diesen Varianten die Ergebnisse der thermischen Entfaltung. Die mittels CD beobachtete Entfaltung zeigt einen besonders starken Einfluß auf die erste Reaktion, also eine Stabilisierung des nativen Zustands relativ zum Intermediat. Die Fluoreszenz-Daten bestätigen die Reihenfolge der Varianten gemäß ihrer Stabilität aus der thermischen Entfaltung.

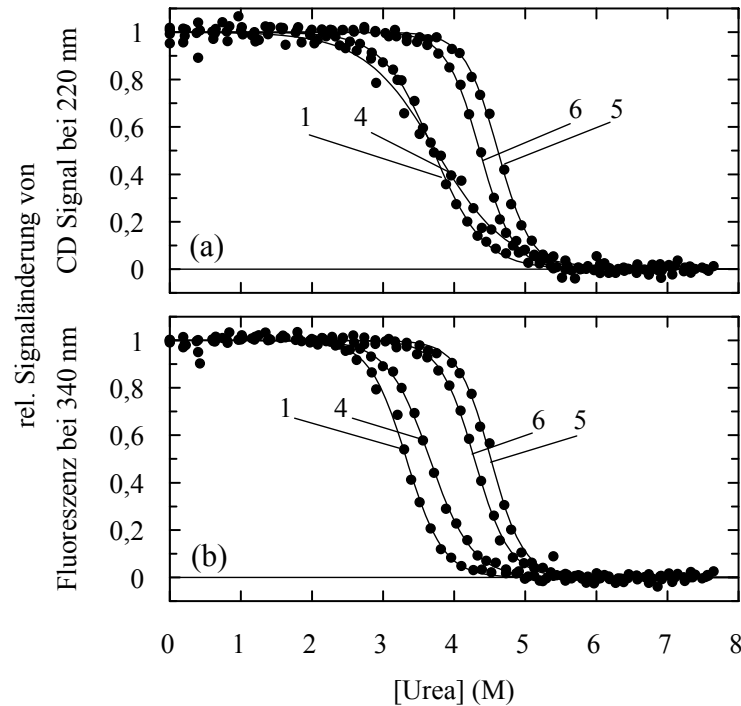


Abbildung 3.60: Harnstoff-induzierte Entfaltung der Varianten aus der Zufallsmutagenese von bLa C77A/C123A beobachtet mittels CD bei 220 nm (a) bzw. Fluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm (b). Dargestellt sind die Übergänge der Varianten β -La V80I/T118I/M182T/L201P (4), β -La K146R/M182T (6) und β -La P62S/V80I/M182T/L201P/I247V (5) im Vergleich zu Wildtyp- β -La (1). Die Übergänge wurden mit 0,35 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Dargestellt sind die relativen Signaländerungen von CD bzw. Fluoreszenz nach Auswertung der Daten gemäß einem Zweizustandsmodell in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration. Die Stabilitätsdaten aus der Zweizustandsanalyse sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.

3.6.4 Sättigungsmutagenese der Positionen 182 und 224

Bei der Betrachtung der Einzelmutationen fällt der besonders stark stabilisierende Effekt der Mutationen an den Positionen 182 und 224 auf (Tabelle 3.18). Diese beiden Mutationen wurden ebenfalls in einer *in vivo*-Selektion von Hecky und Müller (2005) als besonders stabilisierende Mutationen identifiziert. Aus den beiden ersten Selektionen, also der Zufallsmutagenese des β -La Wildtyp-Proteins und der Zufallsmutagenese der Variante β -La C77A / C123A gefolgt von thermischer *Proside*-Selektion, waren bereits die Mutationen M182T und A224V bzw. A224T bekannt. Die Zufallsmutagenese ist in der Anzahl möglicher Mutationen dadurch beschränkt, daß in der Regel nur Einbasenaustausche im Codon einer Aminosäure auftreten. Um die optimale Aminosäurekombination an diesen beiden Positionen zu ermitteln, wurde deshalb eine Sättigungsmutagenese der Positionen 182 und 224 durchgeführt. Dazu wurden diese beiden Positionen vollständig randomisiert und wieder im Hintergrund der disulfidfreien Variante selektiert. In einer thermischen *Proside*-Selektion wurde die Temperatur von 40 °C auf 50 °C in 12 Selektionsrunden erhöht. Alle vier sequenzierten Klone beinhalteten die Mutationen M182T (ATG \rightarrow ACA) und A224V (GCC \rightarrow GTC). Insgesamt konnte für alle selektierten Klone nur eine Codon-Kombination gefunden werden, wobei für Val224 ein anderes Codon als in der Zufallsmutagenese

identifiziert wurde. Es ist daher davon auszugehen, daß diese Mutationen direkt aus der Sättigungsmutagenese stammen.

Die M182T / A224V-Doppelmutation wurde in das Wildtyp-Protein mit intakter Disulfidbrücke eingebaut. Ihr thermischer Übergang ist in Abbildung 3.61 a dargestellt. Mit einem Übergangsmittelpunkt von 58,4 °C ist diese Doppelmutante um 7,6 °C gegenüber dem Wildtyp-Protein stabilisiert (Tabelle 3.18). Um die Reversibilität der Entfaltung zu überprüfen, wurde das Protein kurz auf 65 °C aufgeheizt, schnell abgekühlt und dann erneut thermisch entfaltet. Der zweite Übergang zeigt etwa 40 % der Signaländerung der Entfaltung des nativen Proteins. Die Angabe thermodynamischer Parameter ist im Falle der β -La - Varianten daher nur qualitativ zum Vergleich der Varianten möglich, da das Kriterium der Reversibilität nicht erfüllt wird.

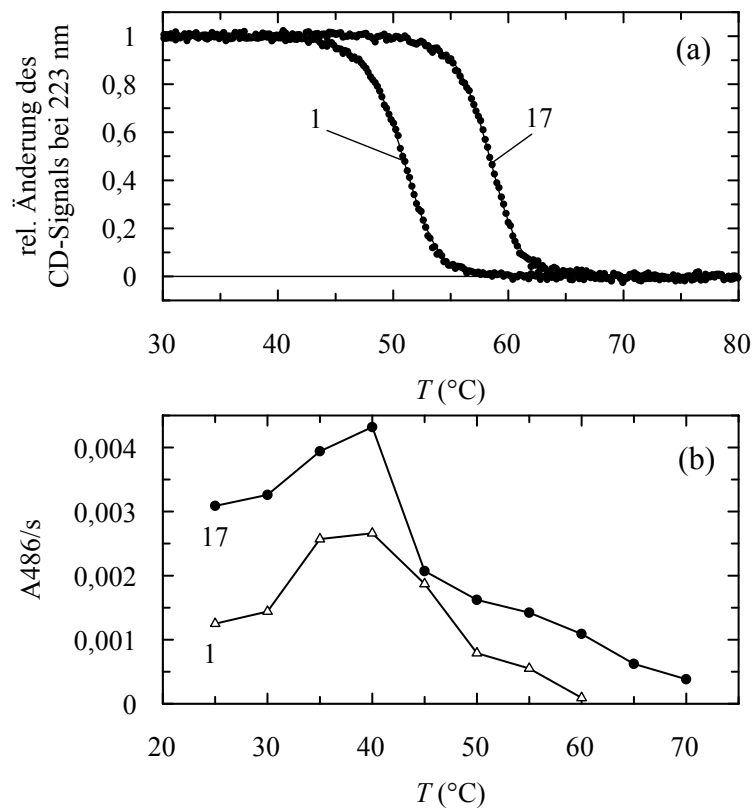


Abbildung 3.61: Charakterisierung der Varianten aus der Sättigungsmutagenese β -La M182X/A224X. (a) Thermische Entfaltung der β -La-Varianten in Gegenwart der C77-C123 Disulfidbrücke. Dargestellt sind β -La Wildtyp (1) und β -La M182T/A224V (17). Die relative Signaländerung des CD bei 223 nm nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden unter den in Abbildung 3.55 angegebenen Bedingungen gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.18 aufgeführt. (b) Temperaturabhängige Aktivität der β -La-Varianten. Gezeigt sind die Temperaturprofile von β -La Wildtyp (1, Δ) und β -La M182T/A224V (17, \bullet). Dargestellt ist die Absorptionsänderung bei 486 nm/s bei Spaltung des chromogenen Substrats Nitrocefin in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Aktivitäten wurden unter den in Abbildung 3.55 angegebenen Bedingungen gemessen.

Der Vergleich der enzymatischen Aktivität der Variante M182T / A224V mit der Wildtyp- β -Lactamase zeigt eine geringfügig höhere Aktivität bei 25 °C, außerdem ist diese Variante bis zu einer Temperatur von 65 °C noch aktiv (Abbildung 3.61 b).

Die Harnstoff-induzierte Entfaltung der β -La-Variante M182T / A224V im Vergleich zum Wildtyp-Protein beobachtet mittels Fern-UV-CD bzw. Fluoreszenz ist in Abbildung 3.62 dargestellt. Harnstoff-induzierte Entfaltung dieser β -La-Variante zeigt eine Stabilisierung des nativen Zustands relativ zum Intermediat. Die Variante M182T / A224V ist relativ zum Wildtyp-Protein um 1,5 M Harnstoff (siehe Fluoreszenzdaten) stabilisiert. Bei einer Auswertung gemäß dem Zweizustandsmodell entspricht dies einer freien Enthalpie in Abwesenheit des Denaturierungsmittels von 57,8 kJ/mol. Auch in diesem Fall ist durch Messung des Übergangs mittels CD eine deutliche Zunahme der Kooperativität für die stabilisierte Variante erkennbar.

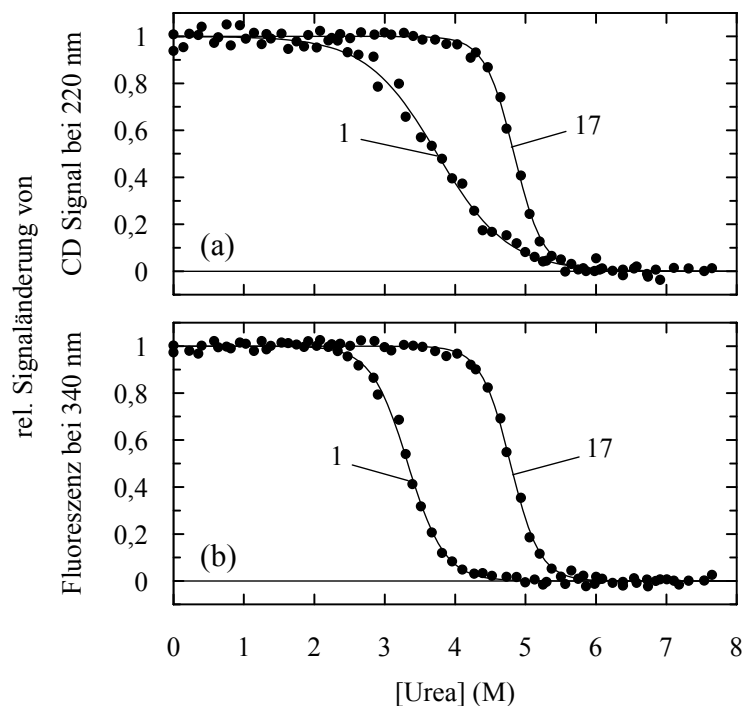


Abbildung 3.62: Harnstoff-induzierte Entfaltung der Variante β -La M182T/A224V (17) im Vergleich zum Wildtyp-Protein (1), beobachtet mittels CD bei 220 nm (a) bzw. Fluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm (b). Die Übergänge wurden mit 0,35 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Dargestellt sind die relativen Signaländerungen von CD bzw. Fluoreszenz nach Auswertung der Daten gemäß einem Zweizustandsmodell in Abhängigkeit von der Harnstoff-Konzentration. Die Stabilitätsdaten aus der Zweizustandsanalyse sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.

3.6.5 Selektion mit dem chemischen Denaturierungsmittel GdmCl

Für die Selektion weiterer stabilisierender Mutationen wurde erneut eine *Proside*-Selektion durchgeführt, diesmal jedoch unter einem anderen Selektionsdruck. Die Phagenbibliothek mit der β -La als Gastprotein wurde mit zunehmenden Konzentrationen an GdmCl bei 25 °C zur Entfaltung behandelt. Dabei wurden drei verschiedene Bibliotheken eingesetzt. Zum einen wurden die beiden Startbibliotheken aus der Zufallsmutagenese der β -La C77A / C123A verwendet, die schon vorher für die eine thermische Selektion dienten. Zum anderen wurde nochmals eine Zufallsmutagenese auf der Grundlage der Variante β -La K146R / M182T durch fehlerbehaftete PCR durchgeführt, ebenfalls im Hintergrund der β -La C77A / C123A. In der folgenden Selektion wurde die GdmCl-Konzentration in zehn Runden von 0,75 M bis

auf 1,75 M erhöht. Drei verschiedene Varianten konnten selektiert werden. Sie sind in Tabelle 3.17 als Varianten C1 (aus der Bibliothek auf der Grundlage von β -La K146R / M182T) und D1 bzw. D2 (aus den Bibliotheken β -La C77A / C123A) aufgeführt. Variante C1 enthält die zusätzliche Mutation R275L, in den anderen Bibliotheken wurden die Varianten β -La E147G und β -La L201P / E240H selektiert. Obwohl in den Bibliotheken aus der Zufallsmutagenese β -La C77A / C123A Varianten mit der Mutation M182T vorhanden waren (in der thermischen Selektion identifiziert), wurden diese in der GdmCl-Selektion nicht gefunden. Die neuen Mutationen dieser Selektion sind Substitutionen geladener Aminosäuren durch Leucin, Glycin bzw. Histidin und könnten durch den ionischen Charakter des Denaturierungsmittels GdmCl beeinflusst sein.

Die Charakterisierung der Varianten erfolgte auch in diesem Fall in Gegenwart der Disulfidbrücke. Abbildung 3.63 a zeigt die thermischen Entfaltungsübergänge der selektierten β -La -Varianten. Die Übergangsmittelpunkte der Varianten sind in Tabelle 3.18 aufgelistet.

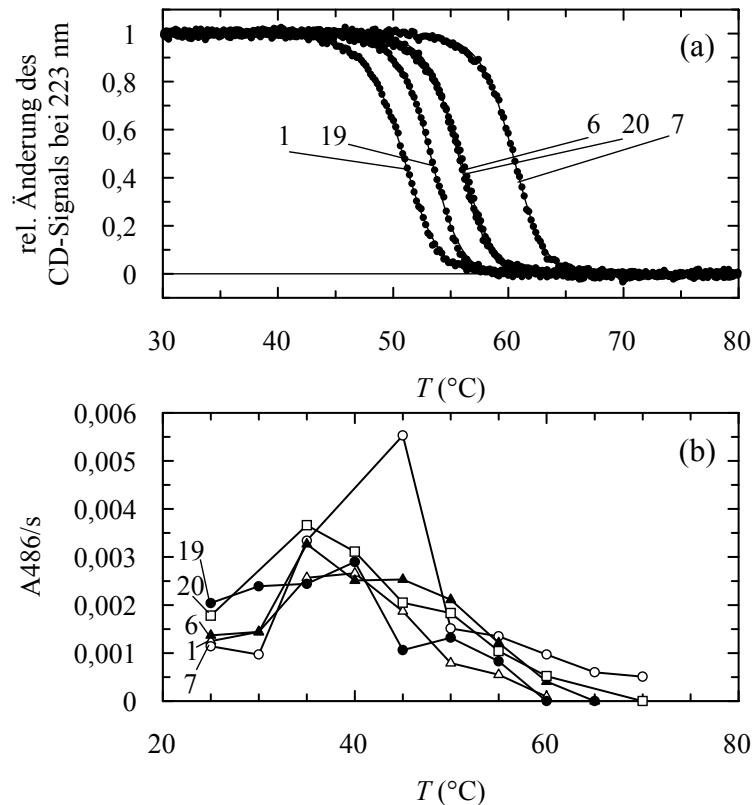


Abbildung 3.63: Charakterisierung der Varianten aus der GdmCl-Selektion von β -La. (a) Thermische Entfaltung der β -La-Varianten im Hintergrund der β -Lactamase mit Disulfidbrücke. Die relative Änderung des CD-Signals nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell ist in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Übergänge wurden unter den in Abbildung 3.55 angegebenen Bedingungen gemessen. Die T_m -Werte sind in Tabelle 3.18 aufgeführt. (b) Temperaturabhängige Aktivität der β -La-Varianten. Gezeigt ist die Absorptionsänderung bei 486 nm/s bei Spaltung des chromogenen Substrats Nitrocefin in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Aktivitäten wurden unter den in Abbildung 3.55 angegebenen Bedingungen gemessen. Dargestellt sind die Temperaturprofile von β -La Wildtyp (1, Δ), β -La K146R/M182T (6, \blacktriangle), β -La K146R/M182T/R275L (7, \circ), β -La E147G (19, \bullet) und β -La R275L (20, \square).

Die thermische Entfaltung zeigt einen deutlich stabilisierenden Effekt der Mutation E147G von 2,4 °C. Den größten Effekt auf die Stabilität hat jedoch die Mutation R275L. Sie erhöht den Schmelzpunkt des Wildtyp-Proteins um 5,0 °C ($T_m = 55,8$ °C). Diese Mutation ist aus natürlich vorkommenden β -Lactamasen bekannt, wurde aber bislang nicht charakterisiert. In Kombination mit den Mutationen K146R und M182T ($T_m = 55,6$ °C β -La K146R / M182T) wird eine Stabilisierung von 9,6 °C, d.h. ein T_m von 60,4 °C erreicht.

Abbildung 3.63 b zeigt die Aktivität der Varianten als Funktion der Temperatur. Auch in diesem Fall sind Unterschiede in der Aktivität der Varianten bei 25 °C erkennbar. Außerdem sind die stabileren Varianten auch bei höherer Temperatur noch aktiv.

3.6.6 Thermodynamische Stabilität in Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Die Ergebnisse der letzten Selektion in Gegenwart von GdmCl zeigen die Anreicherung von Varianten, in denen geladene Aminosäuren gegen Leucin (R275L), Glycin (E147G) oder Histidin (E240H) ersetzt wurden. Damit ergibt sich die Frage, ob eine Änderung der elektrostatischen Wechselwirkungen an der Oberfläche des Proteins für die erhöhte Stabilität verantwortlich sein kann. Elektrostatische Wechselwirkungen an der Oberfläche von Proteinen können mit Gegenionen abgeschirmt werden. Die Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung ΔG_D von der NaCl-Konzentration für die verschiedenen Varianten liefert eine Aussage über veränderte elektrostatische Wechselwirkungen und läßt eine Abschätzung der Coulomb'schen Beiträge zur Gesamtstabilität zu. Für die Varianten E147G, R275L, K146R / M182T / R275L, P62S / V80I / M182T / L201P / I247V und für das Wildtyp-Protein wurden thermische Übergänge bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen gemessen. Abbildung 3.64 zeigt die $\Delta G_D(50$ °C)-Werte für die verschiedenen Varianten in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration.

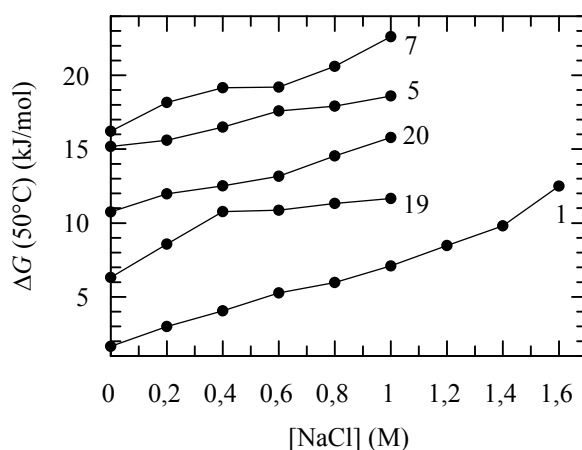


Abbildung 3.64: Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung bei 50 °C ($\Delta G_D(50$ °C)) von der NaCl-Konzentration. Dargestellt sind die Salzabhängigkeiten für β -La Wildtyp (1), E147G (19), R275L (20), P62S/V80I/M182T/L201P/I247V (5) und K146R/M182T/R275L (7). Die NaCl-Abhängigkeiten der $\Delta G_D(50$ °C)-Werte wurden durch Messung thermischer Entfaltungsübergänge in Gegenwart von 0-1,0 M NaCl mit 3 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 gemessen.

Die salzabhängigen thermischen Übergänge konnten nur bis 1,0 M NaCl gemessen werden, weil die β -Lactamase bei höheren Salzkonzentrationen sehr stark aggregiert. Im Falle der betrachteten Einzelvarianten bzw. selektierten Varianten mit Mutationen von geladenen Aminosäuren kann kein signifikanter Unterschied zur Salzabhängigkeit der selektierten Fünffachvariante aus der thermischen Selektion P62S / V80I / M182T / L201P / I247V oder zum Wildtyp-Protein festgestellt werden. Eine Änderung der elektrostatischen Wechselwirkungen scheint deshalb nicht vorzuliegen.

3.6.7 Kombination der stabilisierenden Mutationen

Um den Beitrag jeder einzelnen Mutation zur Stabilität der β -Lactamase zu bestimmen, wurden sie separat in die Wildtypform von β -La mit Disulfidbrücke eingeführt, überexprimiert, und die entsprechenden Proteinvarianten wurden gereinigt und thermodynamisch charakterisiert. Die T_m -Werte sowie die sich bei einer Auswertung nach dem Zweizustandsmodell ergebenden ΔG_D -Werte bei 50 °C sind in Tabelle 3.18 aufgeführt.

Schließlich wurde die beste Variante aus der thermischen Selektion β -La P62S / V80I / M182T / L201P / I247V (Zufallsmutagenese β -La C77A / C123A, Variante 5) mit den Mutationen E147G, I208M, A224V und R275L kombiniert. Die daraus resultierende β -La-Variante mit neun stabilisierenden Mutationen ist um 18,4 °C stabilisiert ($T_m = 69,2$ °C). Dies entspricht einer Zunahme der freien Enthalpie ($\Delta G_D(50$ °C)) von 29 kJ/mol. Abbildung 3.65 a zeigt die thermische Entfaltung dieser stark stabilisierten Variante im Vergleich zum Wildtyp-Protein.

In Abbildung 3.65 b/c ist die Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung dargestellt. Die kombinierte stabilisierte Variante konnte nicht mit Harnstoff entfaltet werden, deshalb wurde in diesem Fall das stärkere Denaturierungsmittel GdmCl für die Entfaltung sowohl der stabilisierten Variante als auch des Wildtyp-Proteins verwendet. Der Entfaltungsübergang des Wildtyp-Proteins zeigt einen zweiphasigen Verlauf. Im Vergleich zur Harnstoff-induzierten Entfaltung sind in diesem Fall die beiden Übergänge deutlich getrennt. Die GdmCl-induzierte Entfaltung wurde sowohl mit Fern-UV-CD als auch mittels Fluoreszenz verfolgt. Die Fluoreszenz-Daten zeigen eine extrem starke Stabilisierung des nativen Proteins (relativ zum Intermediat) in der ersten Reaktion. Im Fall der Wildtyp- β -Lactamase ist im GdmCl-Übergang im Bereich von 2 M GdmCl ansatzweise ein zweiter Übergang erkennbar, der jedoch nicht eindeutig der zweiten Entfaltungsreaktion zugeordnet werden kann. Die Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell ist also auch hier wieder eine Vereinfachung, welche die Daten aber trotzdem gut beschreibt. Die CD-Daten zeigen die Trennung der zwei Übergänge deutlicher. In diesem Fall kann die Entfaltung durch ein Dreizustandsmodell beschrieben werden. Für die kombinierte stabilisierte Variante ist der Entfaltungsübergang hingegen hochkooperativ. Bei Betrachtung der CD-Daten ist für die β -La-Variante mit allen stabilisierenden Mutationen (Nr. 23, Tabelle 3.18) keine Trennung der beiden Entfaltungsreaktionen mehr möglich, da der erste Übergang sehr stark zu höheren GdmCl-Konzentrationen verschoben ist. Die Ergebnisse der GdmCl-induzierten Entfaltung von β -La-

Wildtyp und der β -La-Variante mit allen stabilisierenden Mutationen sind in Tabelle 3.20 zusammengefaßt.

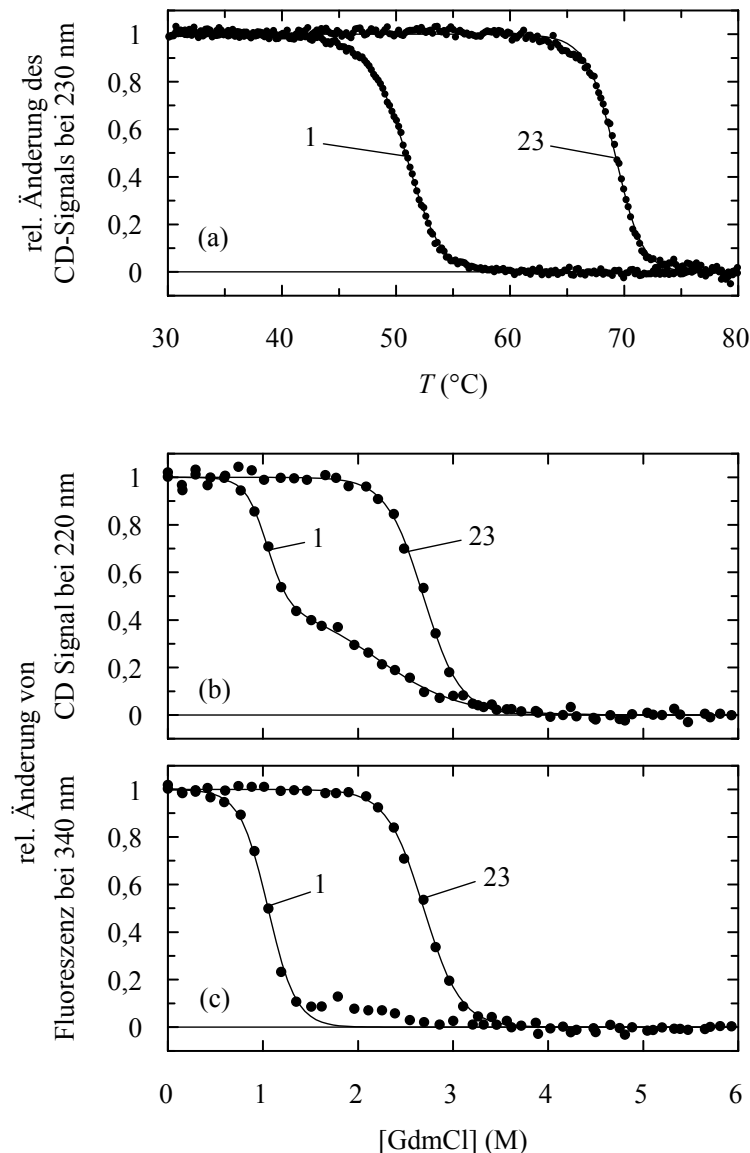


Abbildung 3.65: Stabilität der kombinierten stabilisierten β -La -Variante (23) im Vergleich zu β -La-Wildtyp (1). (a) Thermische Entfaltung der Varianten. Gezeigt ist die relative Änderung des CD-Signals bei 223 nm nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Übergänge wurden mit 4 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. (b) GdmCl-induzierte Entfaltung, gezeigt ist die relative Änderung des CD-Signals bei 220 nm nach Auswertung gemäß einem Zweizustands- bzw. Dreizustandsmodell. (c) GdmCl-induzierte Entfaltung, gezeigt ist die relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 340 nm nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell. Die Übergänge wurden mit 0,35 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C und einer Schichtdicke von 10 mm gemessen. Die Stabilitätsdaten der GdmCl-induzierten Entfaltung sind in Tabelle 3.20 aufgeführt.

Der Vergleich der m -Werte des Wildtyp-Proteins und der maximal stabilisierten Variante zeigt, daß der apparent monophasige Übergang, so wie er bereits mittels CD und Fluoreszenz gemessen wird, nur einen halb so großen m -Wert zeigt, wie der erste Übergang des Wildtyp-Proteins. Dies zeigt deutlich, daß der Übergang der stabilisierten Variante tatsächlich aus zwei eng aufeinander folgenden Übergängen besteht, die zu einer apparenten Verbreiterung der Kurve führen. Die Annahme des Zweizustandsmodells beschreibt die Entfaltung daher nicht

korrekt. Die Kooperativität des zweiten Übergangs ist klein und verringert damit den tatsächlichen m -Wert in der Analyse der Daten. Dieses Ergebnis wird durch den Fluoreszenzübergang bestätigt, wobei ebenfalls vereinfacht ein Zweizustandsmodell angenommen wurde. Die ΔG_D -Werte bei 2,5 M GdmCl von CD- und Fluoreszenzübergang stimmen sehr gut überein. Der Unterschied der Übergänge in Gegenwart von Harnstoff und GdmCl könnte durch den Salzeffekt des GdmCl hervorgerufen werden.

Aus den GdmCl-induzierten Entfaltungsübergängen ergibt sich eine Stabilisierung der kombinierten maximal stabilisierten Variante von $\Delta\Delta G_D = 34$ kJ/mol (CD) bzw. $\Delta\Delta G_D = 36$ kJ/mol (Fluoreszenz) im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Dieser Wert stimmt gut mit dem $\Delta\Delta G_D$ -Wert aus der thermischen Entfaltung (27 kJ/mol) überein.

Tabelle 3.20: Stabilitätsdaten aus der GdmCl-induzierten Entfaltung für β -La-Wildtyp und die maximal stabilisierte Variante β -La P62S/V80I/M182T/L201P/I247V E147G/I208M/A224V/R275L.

Sonde	β -La-Variante	
	Wildtyp	Var. mit allen stab. Mutationen
CD bei 220 nm, 1.Übergang		
$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	1,1	2,7
m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	21,6	12,7
$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	-31,4	2,7
CD (220 nm), 2.Übergang		
$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	2,2	
m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	5,8	
$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	-1,7	
Fluoreszenz (ex 280 nm/em 340 nm)		
$[\text{GdmCl}]_{1/2}$ (M)	1,1	2,7
m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	23,1	12,7
$\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	-33,4	2,5

Angegeben sind der Kooperativitätsparameter m in kJ mol⁻¹ M⁻¹, $\Delta G_D^{25^\circ\text{C}}$ bei 2,5 M GdmCl in kJ/mol und die Denaturierungsmittelkonzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{Urea}]_{1/2}$ in M. Die Übergänge wurden mittels CD bei 220 nm und Fluoreszenz bei 340 nm verfolgt. Die experimentellen Daten aus der Fluoreszenzmessung wurden gemäß einem Zweizustandsmodell angeglichen. Die Analyse der CD-Daten erfolgte für β -La-Wildtyp gemäß einem Dreizustandsmodell, für die Variante mit allen stabilisierenden Mutationen gemäß einem Zweizustandsmodell.

Die Stabilität der kombinierten β -La-Variante (Variante 23, Tabelle 3.18) wurde im Vergleich zum Wildtyp-Protein und zur Variante M182T (Variante 14, Tabelle 3.18) auch mittels DSC bestimmt. Abbildung 3.66 zeigt die thermischen Entfaltungsübergänge der Varianten. Die DSC-Messungen ermöglichen die direkte Bestimmung des Übergangsmittelpunktes T_m , der Enthalpie ΔH , sowie der Wärmekapazität C_p . Die Übergangsmittelpunkte T_m stimmen sehr gut mit den CD-Daten überein und sind in Tabelle 3.21 aufgeführt.

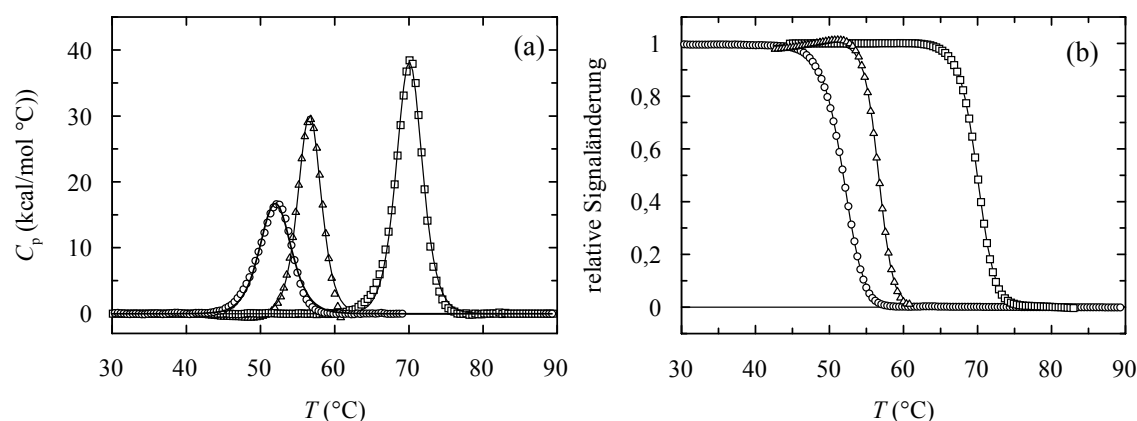


Abbildung 3.66: DSC-Daten von der besten selektierten β -La-Variante aus der Selektion (23, \square), β -La WT (1, \circ) und β -La M182T (14, Δ). (a) Wärmekapazitätsänderung in Abhängigkeit von der Temperatur. (b) Relative Signaländerung in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Messungen wurden mit 10 μ M β -La Wildtyp, 67 μ M β -La M182T und 11 μ M β -La P62S/V80I/E147G/M182T/L201P/I208M/I247V/A224V/R275L in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 mit einer Heizrate von 90 K/h gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte gemäß einem Zweizustandsmodell.

Auch in DSC-Messungen kann die Entfaltung der β -La-Varianten nur als ein hochkooperativer Prozeß beobachtet werden. Die Entfaltungsenthalpie aus CD-Messung und DSC stimmen überein. Für M182T ist die Enthalpie aus der DSC-Messung zu hoch, da bei dieser Variante mit 67 μ M Protein bei einer hohen Proteinkonzentration gemessen wurde und wegen auftretender Aggregation die Festlegung der Basislinie des denaturierten Proteins schwierig ist.

Tabelle 3.21: Stabilitätsdaten der thermischen Entfaltung von β -La.

β -La-Variante	CD bei 223 nm		DSC	
	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)	T_m (°C)	ΔH_D (kJ/mol)
Wildtyp	50,8	558	52,0	623
M182T	56,5	622	56,6	944
P62S/V80I/M182T/L201P/I247V/ E147G/I208M/A224V/R275L	69,2	803	70,1	823

Angegeben sind die Schmelzpunkte und die Entfaltungsenthalpie in kJ/mol für β -La Wildtyp, M182T und β -La mit allen stabilisierenden Mutationen.

Für die kombinierte stabilisierte β -La-Variante ist die enzymatische Aktivität von besonderem Interesse. Die temperaturabhängige Aktivität wurde hier mit zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. Zum einen wurde, wie für die anderen Varianten, die Aktivität bei verschiedenen Temperaturen anhand der Spaltung von Nitrocefin gemessen. Zum anderen wurden die stabilisierte Variante und das Wildtyp-Protein für unterschiedlich lange Zeiten bei 60 °C inkubiert und anschließend die restliche Aktivität bei 25 °C bestimmt. Abbildung 3.67 a/b zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen.

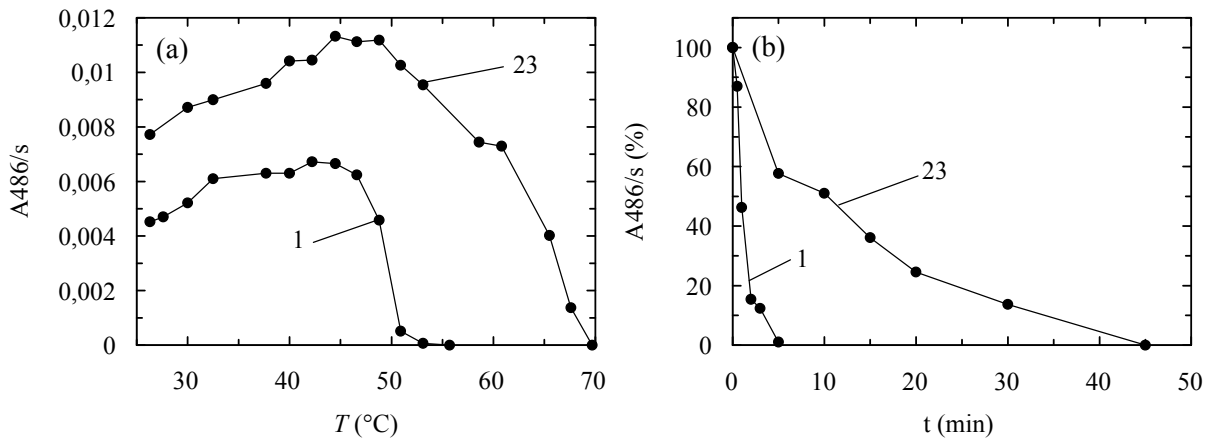


Abbildung 3.67: Aktivität der kombinierten stabilisierten β -La-Variante (23) im Vergleich zur Wildtyp- β -La (1). (a) Aktivität der β -La-Varianten in Abhängigkeit von der Temperatur. (b) Aktivität der β -La-Varianten bei 25 °C nach Denaturierung bei 60 °C für unterschiedliche Zeitspannen. Die Aktivität wurde anhand der Absorptionsänderung bei 486 nm/s mit 2,5 nM Protein in 100 mM Kalium-Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7,0 in Gegenwart von 100 μ M Nitrocefin gemessen. Dargestellt sind die Anfangssteigungen der Spaltungsreaktion bei den verschiedenen Temperaturen bzw. für die verschiedenen Denaturierungszeiten. Die Aktivität des Wildtyp-Proteins bei 25 °C wurde gleich 100 % gesetzt.

Die stabilisierte Variante besitzt im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine etwa verdoppelte Aktivität bei 25 °C. In diesem Fall wurde bei 25 °C unter Substratsättigung gemessen. Das Optimum der Aktivität ist nur leicht zu höheren Temperaturen verschoben, jedoch wird deutlich, daß die stabilisierte Variante im Gegensatz zum Wildtyp-Protein auch bei Temperaturen über 55 °C deutliche Aktivität zeigt. Dieser Unterschied wird noch klarer, wenn man die Aktivität nach Denaturierung bei 60 °C betrachtet. Wildtyp- β -La verliert seine Aktivität bereits nach 5 min Denaturierung bei 60 °C vollständig, wohingegen die stabilisierte Variante erst nach ca. 30-40 min Denaturierung bei 60 °C keine Aktivität mehr besitzt.

Die β -Lactamase-Aktivität wurde auch für die β -La als Fusionsprotein im fd-Phagen bestimmt. Dies sollte einen direkten Stabilitätsvergleich der β -La-Varianten im Phagen ermöglichen. Auch hier wurden temperaturabhängig die β -La-Aktivitäten der Varianten gemessen. Problematisch ist in diesem Fall jedoch die extrem geringe Phagen- bzw. Enzymkonzentration. Bei etwa 10^8 Phagen ist maximal mit einer fM-Konzentration an β -La zu rechnen. Für die Phagen mit unterschiedlichen β -La-Varianten konnten zwar temperaturabhängig Aktivitäten gemessen werden, jedoch ist nur eine qualitative Aussage über die Ergebnisse möglich. Ein direkter Vergleich der Varianten ist schwierig, weil die Konzentration an aktiver β -Lactamase nicht quantifizierbar ist.

3.6.8 Fazit aus der Selektion stabilisierter β -La-Varianten

Die *Proside*-Selektionen nach Zufallsmutagenese der β -La erfolgten immer in Gegenwart von Ampicillin. Dies hatte zwei Gründe: zum einen konnten damit eventuell auftretende rekombinante Phagen zurückgedrängt werden, zum anderen ermöglichte der Ampicillinzusatz eine gleichzeitige Selektion auf Aktivität. Der Verlust des Gastproteins durch Rekombination im Phagengenom ist bei der *Proside*-Selektionsmethode die gravierendste Komplikation. Da

Phagen mit großen Gastproteinen zusätzlich niedrige Infektiositäten besitzen, dominieren die rekombinanten Phagen sehr schnell die Bibliotheken. Mit β -Lactamase (263 Aminosäuren) als Gastprotein sind die Phagen deutlich weniger infektiös als Wildtyp-Phagen ohne Gastprotein (Titer: $\sim 10^7$ cfu/ml, Wildtyp-Phagen: $\sim 10^{10}$ cfu/ml). In der β -Lactamase-Selektion ohne Zusatz von Ampicillin waren daher innerhalb einer Selektionsrunde keine Phagen mit vollständigem Gastprotein mehr vorhanden. Der Zusatz von Ampicillin konnte die Rekombinanten zurückdrängen und so eine Selektion stabilisierter β -Lactamase-Varianten ermöglichen.

3.6.9 Strukturelle Analyse der stabilisierenden Mutationen

Die Struktur der maximal stabilisierten β -La-Variante sollte Aufschluß über den stabilisierenden Effekt der Mutationen geben. Im Rahmen dieser Arbeit kann jedoch nur auf der Grundlage der Kristallstruktur des Wildtyp-Proteins argumentiert werden (*pdb-file* 1btl, Jelsch *et al.*, 1993). Die stabilisierenden Mutationen wurden in die Tertiärstruktur des Wildtyp-Proteins modelliert.

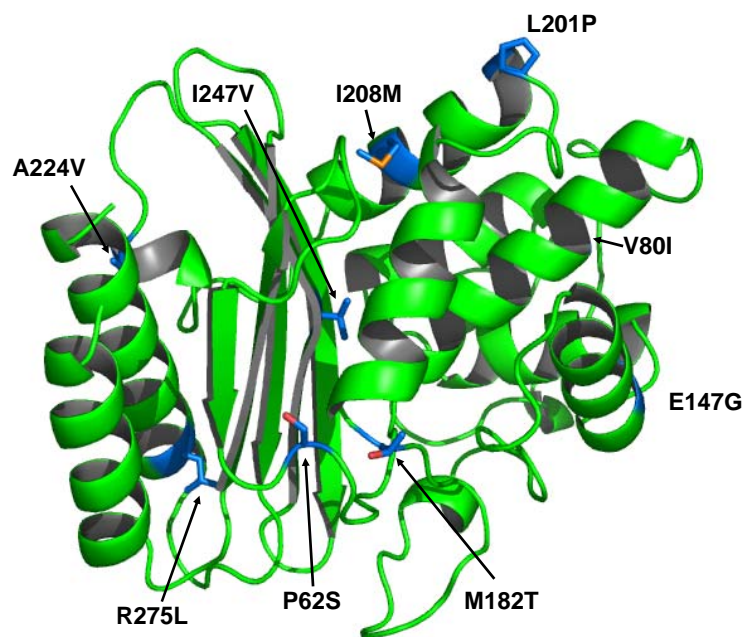


Abbildung 3.68: Kristallstruktur von β -La-Wildtyp mit allen Mutationen der kombinierten stabilisierten Variante. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific, 2005) erstellt. Die Struktur basiert auf den Kristallstrukturdaten 1btl von Jelsch *et al.* (1993) der TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli*. Dargestellt sind die Mutationen der kombinierten stabilisierten β -La-Variante im Stäbchenmodell. Die Mutationen wurden anhand des Programms *Swiss-pdb viewer* in die Tertiärstruktur des Wildtyp-Proteins modelliert.

Vanhove *et al.* haben die Ursachen für die Stabilitätsunterschiede von fünf Klasse A- β -Lactamasen untersucht, die sich in ihrer Primärsequenz und der Struktur sehr ähneln. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war eine Korrelation zwischen der Stabilität und der Anzahl intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken. Die globale Hydrophobizität des Proteins spielte dabei eine geringere Rolle (Vanhove *et al.*, 1995b). Diese Ergebnisse sind

auch für die Mutationen der stabilisierten β -La-Variante zutreffend. Der mögliche Effekt der Mutation M182T wurde bereits theoretisch analysiert. Es wurde vermutet, daß Thr182 zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu63 eingehen kann (Huang und Palzkill, 1997). In der stabilisierten Variante ist Pro62 zu Serin mutiert, und die Mutation P62S ist in der Selektion zusammen mit M182T aufgetreten. Position 62 ist ebenfalls in unmittelbarer Nähe zum Glu63, so daß in diesem Fall die Ausbildung weiterer Wasserstoffbrückenbindungen eine Erklärung für die erhöhte Stabilität sein kann. Ein Ausschnitt aus der Kristallstruktur, der die Positionen 182, 63 und 62 umfaßt, ist in Abbildung 3.69 a dargestellt.

Position 80 ist in der Nähe der Disulfidbrücke C77-C123 lokalisiert. Der stabilisierende Effekt der Mutation V80I könnte damit in Abwesenheit der Disulfidbrücke ein anderer sein als im disulfidverbrückten Hintergrund. In der C77A / C123A-Variante, also dem Protein für die Selektion, ist durch den Ersatz durch zwei Alanine mehr Platz für den Val→Ile-Austausch. Im disulfidverbrückten Protein stabilisiert die Mutation das Protein nur um etwa 0,8 °C. Die größere Aminosäure Isoleucin, umgeben von einer Vielzahl hydrophober Aminosäuren, könnte zu einer günstigen Packung im Innern des Proteins führen (Abbildung 3.69 b).

Eine ähnliche Erklärung könnte für die Mutation A224V zutreffen. Die Nähe zu einer Vielzahl hydrophober Aminosäuren spricht für verbesserte hydrophobe Interaktionen durch die Mutation zum Valin (Abbildung 3.69 e). Die Selektion des C ^{β} -verzweigten Valins hat vermutlich eine bessere Raumerfüllung in diesem Bereich zur Folge. Gleichzeitig erklärt die hydrophobe Umgebung im Bereich der Position 224 die geringfügige Destabilisierung durch die Mutation A224T (Nr. 12, Tabelle 3.18). Prolin an Position 201 ist als N-terminale Aminosäure der α -Helix günstig, da am N-Terminus der Helix ungepaarte H-Brücken vorliegen.

Der stabilisierende Effekt der Mutation R275L ist aus der Struktur des Wildtyp-Proteins nicht erklärbar (Abbildung 3.69 f). An Position 275 tritt in einigen *extended-spectrum*- β -Lactamasen ebenfalls ein Leucin oder ein Glutamin auf. Eine geladene Aminosäure scheint hier ungünstig zu sein, die Lösungsmittelzugänglichkeit von Arg275 im Wildtyp-Protein (50 % zugängliche Oberfläche) spricht jedoch nicht dafür. Grund für die Selektion könnte auch die Größe der Seitenkette sein. Ungünstige Wechselwirkungen mit Arg244 (etwa 7 Å Abstand) könnten ebenfalls für den stabilisierenden Effekt von Leucin an dieser Position verantwortlich sein.

Einige der selektierten Aminosäuren sind an der Domänengrenzfläche lokalisiert (I247V, P62S, I208M). Eine Verbesserung der Domäneninteraktionen kann in diesem Fall eine Erklärung für den stabilisierenden Effekt der Mutationen sein (Abbildung 3.68).

NMR-Untersuchungen haben gezeigt, daß die TEM-1 β -Lactamase eine sehr geordnete Struktur besitzt, selbst der Ω -Loop zeigt eine geringe Flexibilität. Für den Ω -Loop und die Reste des aktiven Zentrums konnten Konformationsänderungen im μ s- bis ms-Bereich beobachtet werden, die vermutlich für die katalytische Aktivität von Bedeutung sind. Globale

Konformationsänderungen treten in der β -Lactamase damit nur begrenzt auf (Savard und Gagné, 2006).

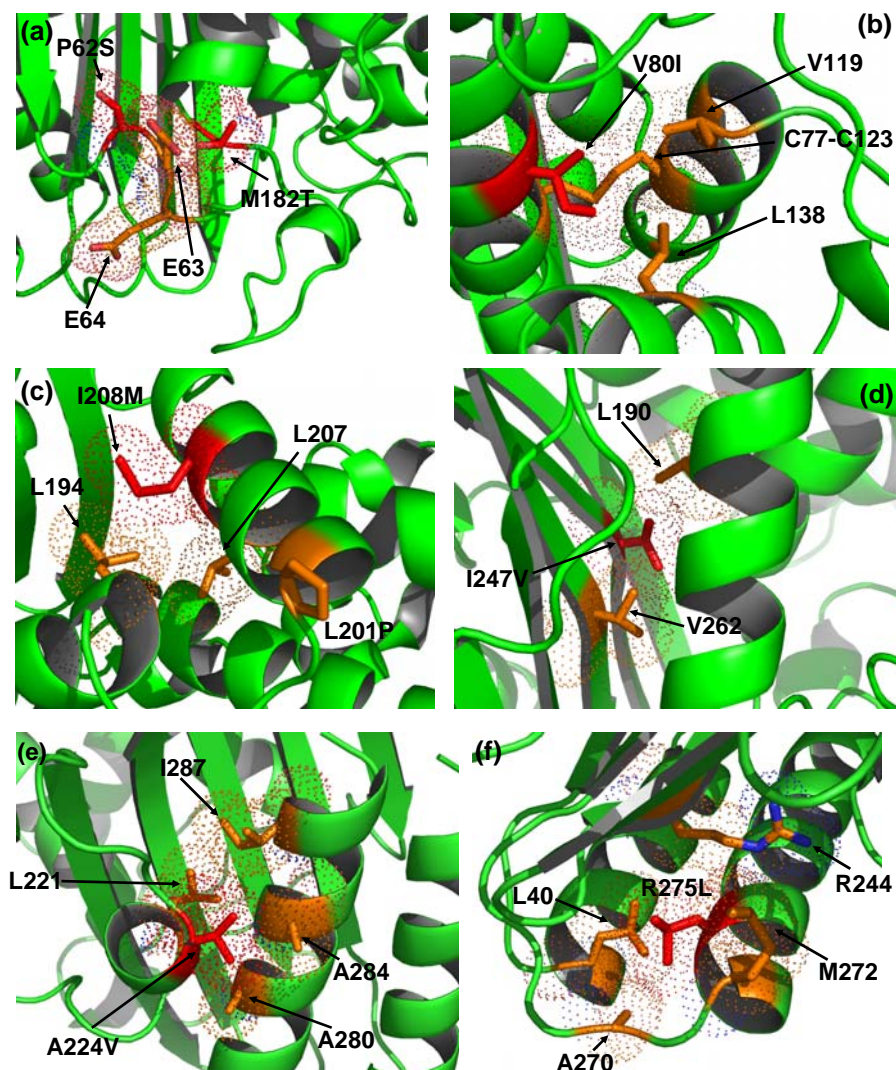


Abbildung 3.69: Ausschnitte aus der Kristallstruktur von β -La-Wildtyp. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific, 2005) erstellt. Die Struktur basiert auf den Kristallstrukturdaten 1btl von Jelsch *et al.* (1993). Dargestellt sind die Mutationen der kombinierten stabilisierten β -La-Variante im Stäbchenmodell bzw. mit den van-der-Waals-Radien der Atome. (a) Bereich der Mutation V80I, (b) Bereich der Mutationen P62S und M182T, (c) Bereich der Mutationen L201P und I208M, (d) Bereich der Mutation I247V, (e) Bereich der Mutation A224V, (f) Bereich der Mutation R275L. Die Mutationen wurden anhand des Programms *Swiss-pdb viewer* in die Tertiärstruktur des Wildtyp-Proteins modelliert.

3.6.10 Faltungskinetik der stabilisierten β -Lactamase-Variante im Vergleich zum Wildtyp-Protein

Die Untersuchung der Faltungskinetik der β -La-Variante mit allen stabilisierenden Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Protein gibt Aufschluß über den Effekt der stabilisierenden Mutationen auf den Faltungsmechanismus des Proteins.

3.6.10.1 Faltungskinetik von β -La-Wildtyp

Die Betrachtung der Struktur der β -La wirft ein Problem für den Faltungsmechanismus auf. Der zentrale Bereich des Proteins bildet eine globuläre Einheit mit hauptsächlich α -helikaler Struktur, und die N- und C-terminalen Bereiche des Proteins bilden gemeinsam ein fünfsträngiges β -Faltblatt. Dies bedeutet, daß weder der N-, noch der C-Terminus des Proteins entfalten können, ohne die gesamte Struktur zu zerstören. Für den Faltungsmechanismus bedeutet dies, daß entweder zunächst die α -helikale Einheit und später die β -Struktur gebildet wird oder daß die beiden Einheiten unabhängig voneinander falten (Vanhove *et al.*, 1998b). Für die TEM-1 β -Lactamase konnte festgestellt werden, daß sich zunächst eine *molten globule*-artige α -helikale Domäne ausbildet, wobei die N- und C-terminalen Bereiche kollabiert, jedoch noch nicht strukturiert vorliegen. Die Entfaltungs- und Rückfaltungsraten für die Faltungsreaktionen des Wildtyp-Proteins sind in Abbildung 3.70 in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration in einer Chevron-Auftragung dargestellt.

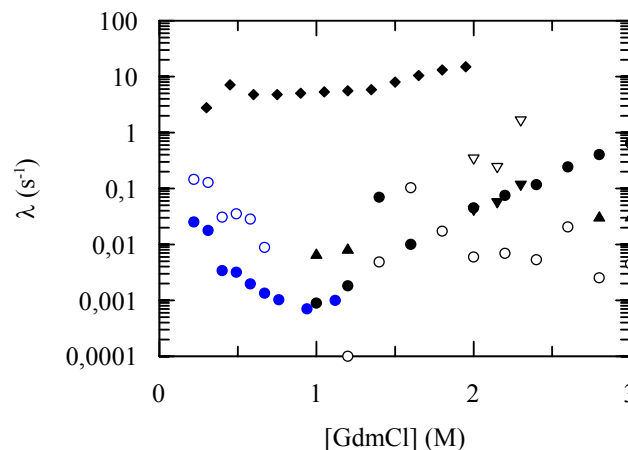


Abbildung 3.70: Chevron-Auftragung der Faltungsraten von β -La Wildtyp. Faltung des frühen Intermediates (\blacklozenge), schnelle Entfaltungsphase (\bullet), langsame Entfaltungsphase (\circ , \blacktriangle), *stopped-flow*-Daten für die schnelle (∇) und langsame (\blacktriangledown) Entfaltungsphase, schnelle (\circ) und langsame (\bullet) Rückfaltungsphase. Die Kinetiken wurden mit $0,2 \mu\text{M}$ Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 anhand der Fluoreszenzänderung bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm bei 25°C und einer Schichtdicke von 1 cm verfolgt (Bandbreiten: 3 nm (Anregung), 5 nm (Emission)).

Für die Faltung der TEM-1 β -Lactamase konnten sechs verschiedene Phasen beobachtet werden, wovon vier Phasen mittels intrinsischer Fluoreszenz des Proteins beobachtet werden können (Vanhove *et al.*, 1998b). Die *burst*-Phase läuft innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Mischung ab (Zeitkonstante $\tau < 1 \text{ ms}$) (Vanhove *et al.*, 1998a). Dann bildet sich ein frühes Intermediat mit einer Zeitkonstante von $\tau_1 = 140 \text{ ms}$ in Gegenwart von $0,4 \text{ M}$ GdmCl. Es folgt eine schnelle Rückfaltungsphase mit $\tau_2 = 32 \text{ s}$ (in $0,4 \text{ M}$ GdmCl) dann eine langsame Phase mit $\tau_3 = 296 \text{ s}$ (in $0,4 \text{ M}$ GdmCl) (Abbildung 3.70). Bei Betrachtung der Faltung über die enzymatische Aktivität und mittels Fluoreszenz fällt ein zweiphasiger Verlauf der Faltungskinetiken auf (Gervasoni und Plückthun, 1997; Vanhove *et al.*, 1995). Die Polypeptidkette faltet folglich über zwei parallele Faltungswege. Während die langsame

Faltungsphase ($\tau = 296$ s) der *trans* \rightarrow *cis* - Isomerisierung der E166-P167 Peptidbindung im Ω -Loop zuzuordnen ist, repräsentiert die schnellere Phase ($\tau_2 = 32$ s) die Isomerisierung anderer Prolin-Reste (insgesamt 12 in der β -La) (Vanhove *et al.*, 1996; Vanhove *et al.*, 1995).

3.6.10.2 Faltungskinetik von β -La mit allen stabilisierenden Mutationen

Für die β -La-Variante mit allen stabilisierenden Mutationen (Variante 23) wurde ebenfalls die Faltung analysiert. Abbildung 3.71 zeigt beispielhafte Rückfaltungs- und Entfaltungsreaktionen nach manueller Mischung und nach schneller Mischung in der *stopped-flow*-Apparatur.

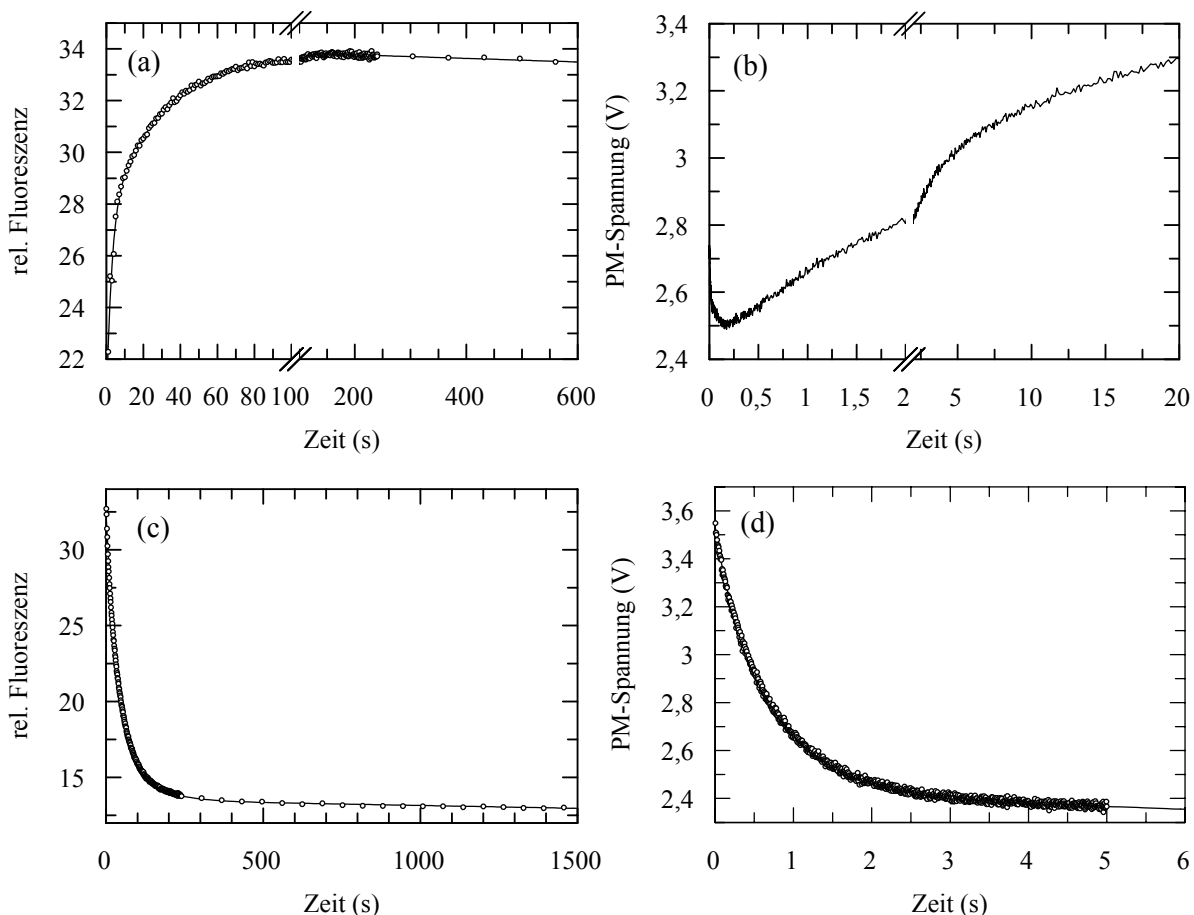


Abbildung 3.71: Beispielhafte Rückfaltungskinetiken der stabilisierten β -La-Variante bei (a) 0,36 bzw. (b) 0,4 M GdmCl und Entfaltungskinetiken bei (c) 4,40 M und (d) 5,60 M GdmCl. Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm in Abhängigkeit von der Zeit bzw. die Änderung der PM-Spannung der *stopped-flow*-Apparatur (b, d) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Kinetiken wurden mit 0,2 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 bei 25 °C gemessen. Bei manueller Mischung (a, c) wurde bei einer Schichtdicke von 1 cm gemessen, bei schneller Mischung in der *stopped-flow* wurde die integrale Fluoreszenz nach Anregung bei 280 nm gemessen. Als *cut-off*-Filter wurde Aceton verwendet (Fluoreszenz oberhalb von 320 nm).

Die Rückfaltung kann anhand der Zunahme der Tryptophanfluoreszenz bei 340 nm beobachtet werden. Dabei geht den beiden langsamen Prolin-limitierten Phasen die schnelle Phase des frühen Intermediats voraus. Für Entfaltung und Rückfaltung können jeweils zwei Phasen beobachtet werden. Die erste Entfaltungsphase hat eine große Amplitude und

bestimmt die Entfaltungsreaktion. Die zweite Entfaltungsphase hat nur eine sehr geringe Amplitude und ist unabhängig von der GdmCl-Konzentration. Es könnte sich hier um Prolylisomerisierung im entfalteten Protein handeln. Allerdings können Artefakte, wie Verdünnungseffekte nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Chevron-Auftragung der Faltungsraten ist in Abbildung 3.72 dargestellt.

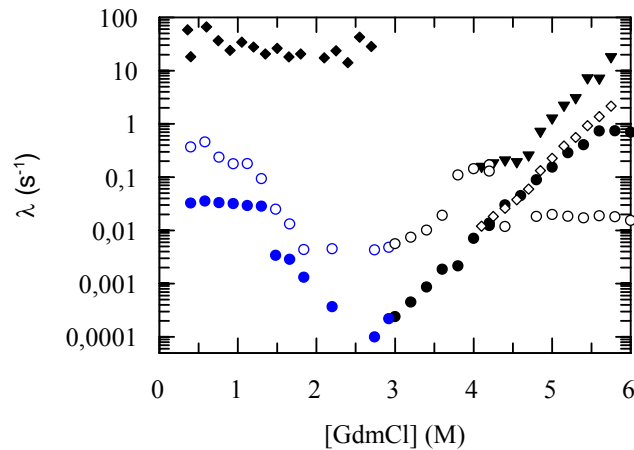


Abbildung 3.72: Chevron-Auftragung von β -La mit allen stabilisierenden Mutationen (P62S/V80I/M182T/L201P/I247V E147G/I208M/A224V/R275L). Faltung des frühen Intermediates (◆), erste Entfaltungsphase (●), zweite Entfaltungsphase (○), *stopped-flow*-Daten für die schnelle (▼) und langsame (◇) Entfaltungsphase, schnelle (○) und langsame (●) Rückfaltungsphase. Die Kinetiken wurden mit 0,2 μ M Protein in 50 mM Natrium-Phosphat, pH 7,0 anhand der Fluoreszenzänderung bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm bei 25 °C und einer Schichtdicke von 1 cm verfolgt (Bandbreiten: 3 nm (Anregung), 5 nm (Emission)).

Bei der stabilisierten β -Lactamase-Variante ist die Rückfaltung kaum beeinflusst. Das frühe Intermediat bildet sich mit einer Zeitkonstante von $\tau_1 = 15$ ms (in 0,4 M GdmCl), also etwa zehnmal so schnell wie im Wildtyp-Protein. Auch die beiden langsamen Phasen sind mit Zeitkonstanten von $\tau_2 = 3$ s und $\tau_3 = 30$ s bei 0,4 M GdmCl etwa um den Faktor zehn gegenüber dem Wildtyp-Protein beschleunigt. Die Entfaltung ist hingegen bei 3 M GdmCl mit einer Zeitkonstante von $\tau = 4100$ s um etwa den Faktor 2000 langsamer als beim Wildtyp-Protein ($\tau = 2$ s). Die Stabilisierung der β -Lactamase durch die selektierten Mutationen beruht damit nahezu ausschließlich auf einer verlangsamten Entfaltung und somit auf der Stabilisierung des nativen Zustands.

Die langsame Rückfaltungsrate in der β -Lactamase-Kinetik ($\tau_3 = 314$ s in 0,5 M GdmCl) ist der Prolylisomerisierung zuzuordnen. Der Versuch der Katalyse dieser Faltungsrate der Variante β -La C77A / C123A mittels verschiedener Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen (SlyD, FKBP12-IF1, Cyclophilin 18 und Trigger-Faktor) führte jedoch zu keiner signifikanten Erhöhung der Rückfaltungsrate. Die entsprechende Prolyl-Peptidbindung ist offenbar nicht für die Isomerasen zugänglich.

3.6.11 Fazit der *in vitro*-Evolution von TEM-1 β -Lactamase

Die TEM-1 β -Lactamase inaktiviert β -Lactam-Antibiotika. Ein optimales Verständnis der Prinzipien von Aktivität und Stabilität dieses Enzyms ist daher für die Entwicklung modifizierter β -Lactam-Antibiotika unerlässlich. Ferner dient die β -Lactamase als Modellprotein für Stabilitäts- und Faltungsuntersuchungen.

Ziel dieser Arbeit war die Selektion stabilisierter β -Lactamase-Varianten mit dem *Proside*-Selektionssystem. Der Einbau von β -Lactamase mit ihren 263 Aminosäuren als Gastprotein in das Gen-3-Protein des Phagen hatte eine deutliche Reduktion seines Titors zur Folge. Dieses Problem der geringeren Infektiosität konnte bereits von Krebber *et al.* bei der Analyse der Infektiositäten verschiedener Phagenkonstrukte festgestellt werden (Krebber *et al.*, 1997). Die erfolgreiche Selektion stabilisierter β -La-Varianten in Gegenwart von Ampicillin zeigt, daß β -La als Fusionsprotein mit dem G3P des Phagen im Periplasma der infizierten *E. coli*-Zellen enzymatisch aktiv ist. Dies konnte durch die meßbare Aktivität der β -La im gereinigten Phagen *in vitro* bestätigt werden.

In vitro-Evolution wurde im Fall der β -Lactamase bisher vor allem im Hinblick auf eine erhöhte β -La-Aktivität angewendet. Die in natürlich vorkommenden sogenannten *extended spectrum*- β -Lactamasen mutierten Positionen 104, 164 und 237-240 waren dabei von besonderem Interesse (Zaccolo und Gherardi, 1999; Stemmer, 1994). Der mit dem Aktivitätsgewinn häufig einhergehende Stabilitätsverlust durch diese Mutationen war dabei häufig durch zusätzliche Mutationen entfernt vom aktivem Zentrum kompensiert (Wang *et al.*, 2002). Die Mutation M182T ist eine solche generelle Suppressor-Mutation (Huang and Palzkill, 1997). Diese besonders wichtige und stark stabilisierende Mutation wurde auch in dieser Arbeit mit dem Ziel erhöhter thermodynamischer Stabilität häufig selektiert. Aktivität und Stabilität der β -Lactamase sind daher nur schwer unabhängig voneinander zu bewerten. Hecky und Müller konnten eine ähnliche Beobachtung machen (Hecky und Müller, 2005). Durch *in vivo*-Selektion mit N-terminal verkürzten und dadurch inaktiven β -Lactamase-Varianten in Gegenwart von Ampicillin konnten Varianten identifiziert werden, die neben β -La-Aktivität auch eine erhöhte Stabilität aufweisen.

Durch *Proside*-Selektion konnten neben M182T die besonders stark stabilisierenden Mutationen A224V und R275L gefunden werden. Auch die Mutation R275L tritt in natürlichen β -Lactamase-Varianten auf (TEM-38, TEM-68). Struktur-Stabilitätsanalysen auf der Grundlage der Raumstruktur des Wildtyp-Proteins lassen keine eindeutige Aussage bezüglich der molekularen Basis der stabilisierenden Effekte zu. Allerdings scheinen die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrücken, die Optimierung von Ladungswechselwirkungen und eine verbesserte Seitenkettenpackung an der Stabilisierung beteiligt zu sein.

Wie schon erwähnt, müssen alle selektierten Varianten β -La-Aktivität besitzen, und tatsächlich unterscheiden sie sich nur minimal in ihrer Aktivität bei 25 °C. Eine genauere Analyse der β -La-Aktivität ist hier nicht möglich, da die Messungen nicht unter Substratsättigung durchgeführt wurden. Die stabilisierte Kombinationsvariante wird in der

Gruppe von A. Matagne (Lüttich, Belgien) in Bezug auf ihre katalytischen Eigenschaften genauer analysiert. Insgesamt konnte durch die *Proside*-Selektionen die thermodynamische Stabilität und die Kooperativität der β -Lactamase stark verbessert werden. Die selektierten Mutationen sind über die gesamte Struktur verteilt, und ihre stabilisierenden Beiträge sind nahezu additiv. Auffällig ist die Selektion von Mutationen, die auch natürlich vorkommen und stark zur Stabilität des Proteins beitragen. Um die Stabilitätsdaten auch auf struktureller Ebene analysieren zu können und den Effekt der Mutationen auf die Wechselwirkungen im Protein zu verstehen, wäre die Kristallstruktur der stabilisierten Kombinationsvariante sehr hilfreich.

3.7 Etablierung eines alternativen Selektionssystems zur Stabilisierung von Proteinen

3.7.1 *Evolutionäre Stabilisierung N-terminaler G3P-Fusionsproteine*

Wie bereits für die Selektion stabilisierter β -Lactamase-Varianten unter 3.6.8 erläutert, ist das *Proside*-System nicht allgemein anwendbar. Bei der Insertion von großen Gastproteinen zwischen die N2- und die CT-Domäne ist die Infektiosität der entsprechenden Phagen stark abhängig von der Größe der eingebauten Gastproteine. Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens homologer Sequenzen in der DNA und damit die Gefahr von homologer Rekombination erhöht. Verliert ein Phage durch Rekombination große Teile des inserierten Gastproteins, so gehen damit auch potentielle Schnittstellen für die Protease verloren. Der entsprechende Phage hat damit also einen deutlichen Vorteil in der *in vitro*-Selektion mit einer Protease. Rekombinante Phagen haben aber auch in der folgenden *in vivo*-Selektion, bei der Infektion von *E. coli*, einen großen Vorteil, da sie deutlich infektiöser sind als die Phagen mit Gastprotein. Diese beiden Vorteile führen zu einer starken Anreicherung rekombinanter Phagen in den Bibliotheken und damit zu einem Verdrängen der Phagen mit vollständigem Gastprotein. In der Selektion stabilisierter β -Lactamase-Varianten konnte eine Selektion nur durch zusätzliche Selektion auf Ampicillinresistenz erfolgreich durchgeführt werden.

Neben der β -Lactamase wurden Carrageenase, verschiedene Chimären des Enzyms HisF (Imidazolglycerinphosphat-Synthase) und LipaseB zwischen N2- und CT-Domäne des Phagen eingebaut. HisF hat vor allem für die Aufklärung der Evolution von $(\beta\alpha)_8$ -Barrel-Proteinen eine besondere Bedeutung, Carrageenase und LipaseB sind potentiell wichtige Enzyme für die Biotechnologie. LipaseB enthält eine Vielzahl von Disulfidbrücken. Wie im ersten Teil der Arbeit erläutert, kann dies für die Infektiosität der Phagen problematisch sein (3.1). Der Phage mit stabilisiertem, disulfidfreiem G3P sollte in diesem Fall Abhilfe schaffen. Neben den Disulfidbrücken ist jedoch in diesem Fall die Größe des Proteins limitierend. Die Phageninfektiosität ist niedrig und damit der Phagentiter für eine Selektion zu gering. Für die Carrageenase (276 Aminosäuren) wurden auf der Grundlage des disulfidfreien Enzyms Bibliotheken zur Selektion auf Stabilität erstellt. Die bereits beschriebene homologe Rekombination führte jedoch zu einem Verdrängen der Phagen mit vollständigem Gastprotein aus den Bibliotheken, und zwar innerhalb nur einer Selektionsrunde. Für das Enzym HisF bzw. chimäre Varianten dieses Proteins (Kooperation mit der AG Prof. Sterner, Regensburg) konnte ebenfalls keine Möglichkeit gefunden werden, die rekombinanten Phagen aus den Bibliotheken zurückzudrängen. In allen Fällen ist der Phagentiter extrem niedrig (etwa 10^6 cfu/ml).

Da das *Proside*-Selektionssystem für große Proteine nur eingeschränkt angewendet werden kann, sollte ein abgewandeltes System etabliert werden, das die Probleme der Infektiosität und idealerweise der Rekombination umgeht. Dazu sollte das Gastprotein nicht zwischen die N2- und die CT-Domäne inseriert, sondern an den N-Terminus des G3P angefügt werden. Ein

zusätzlicher N-terminaler *Tag* am G3P könnte dann der Selektion stabilisierter Proteinvarianten dienen. Das Prinzip der Selektion ist in Abbildung 3.73 dargestellt.

Eine Bibliothek des zu stabilisierenden Gastproteins wird zwischen einen N-terminalen *Tag* und die N1-Domäne des G3P des filamentösen Phagen eingebaut. Die resultierende Phagenbibliothek wird dann an eine Affinitätsmatrix gebunden und einer Proteolyse unterworfen. Phagen, die unter den gewählten Selektionsbedingungen instabile Varianten des Gastproteins enthalten, sind für die Protease zugänglich und können von dieser gespalten werden. In diesem Fall verlieren die zugehörigen Phagen allerdings nicht ihre Infektiosität, wie im *Proside*-System, denn das für die Infektion verantwortliche G3P bleibt intakt. Bei Proteolyse wird jedoch der N-terminale *Tag* abgespalten, und der entsprechende Phage bindet nicht mehr an die Affinitätsmatrix. Nur wenn die Gastproteinvarianten stabil sind und damit gefaltet vorliegen, kann die Protease nicht spalten, der *Tag* bleibt erhalten, und Phagen mit stabilisierten Gastproteinvarianten können über den Affinitätsschritt selektiert werden. Im Vergleich zu *Proside* ist die erhöhte Proteaseresistenz der stabilisierten Proteinvarianten in diesem Fall nicht mit der Infektiosität der Phagen gekoppelt, sondern mit deren Affinität zu einer Trägermatrix.

Der Vorteil der Insertion des Gastproteins zwischen N-terminalem *Tag* und N1-Domäne ist die Möglichkeit, große Proteine ohne Verlust der Infektiosität des Phagen einzubauen. Heinis *et al.* konnten dies am Beispiel der Prolyl-Endopeptidase zeigen, einem 78 kDa großen Enzym. Bei Einbau des Proteins zwischen die N2- und die CT-Domäne des G3P waren keine infektiösen Phagen vorhanden, bei Einbau an der Phagenspitze besitzen die Phagen die gleiche Infektiosität wie Wildtyp-Phagen (Heinis *et al.*, 2004). Nachteil dieses Systems ist jedoch, daß die Selektion von der Affinität des *Tags* zur Matrix abhängt. Der Erfolg der Selektion ist damit von der Bindung an die Matrix abhängig. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene *Tags* zur Selektion getestet.

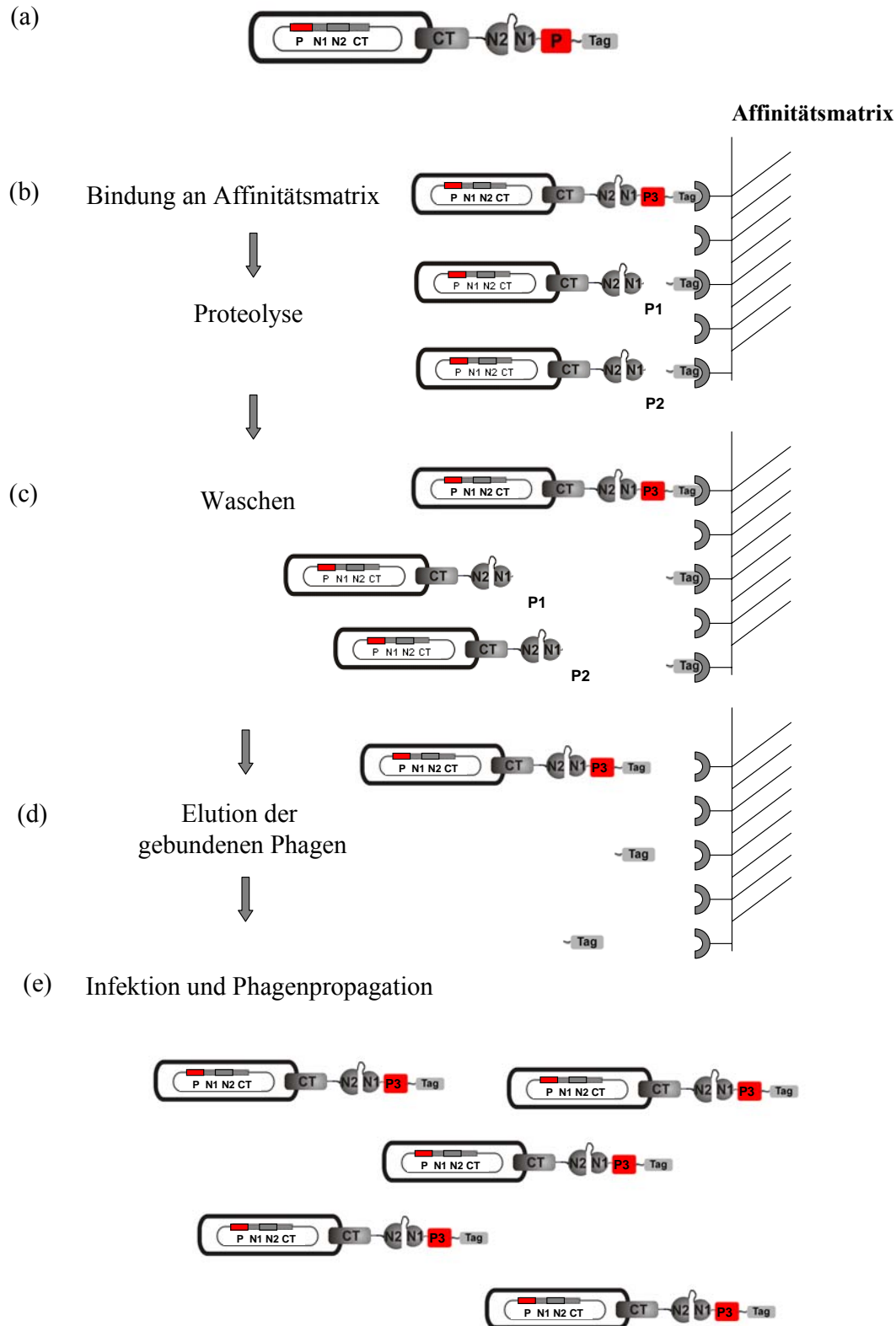


Abbildung 3.73: Abwandlung des *Proside*-Systems zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten. (a) Phagenkonstrukt für die abgewandelte *Proside*-Selektionsmethode. (b) Die Phagenbibliothek wird an einer Affinitätsmatrix gebunden und dann einer Proteolyse unterworfen. Instabile Gastproteinvarianten werden gespalten. (c) Proteolysierte Phagen werden von der Matrix gewaschen, so daß nur Phagen mit stabilem Gastprotein gebunden bleiben. (d) Elution der gebundenen Phagen von der Affinitätsmatrix. (e) Infektion von *E. coli*-Zellen und Phagenpropagation.

3.7.2 Konstruktion eines Phagen mit N-terminalem His₆-Tag zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten

Da ein Selektionssystem auf der Grundlage eines N-terminalen His₆-Tags bereits aus Stabilisierungsversuchen von Ubiquitin bekannt ist (Finuncane *et al.*, 1999a; Finuncane und Woolfson, 1999b), wurde ein entsprechendes Phagenkonstrukt verwendet. Die Aminosäure-Sequenz des Konstrukts mit den eingeführten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Stu*I, *Xba*I und *Pst*I und dem zusätzlichen His₆-Tag ist in Abbildung 3.74 aufgeführt.

ATG-Signalsequenz Phage-(His)₆-Gly-Ser-(Arg-Pro)-Ser-Gly-(Ser-Arg)-Ser-
*Stu*I*Xba*I
 Ser-Ser-Gly-(Leu-Gln)-Gly-Ser-Glu-[Ala-.....
*Pst*IN1

Abbildung 3.74: Aminosäuresequenz des Phagen-Konstrukts mit N-terminalen His₆-Tag. Angegeben sind die zusätzlich in das Phagen-G3P eingeführten Aminosäuren.

Um die Voraussetzungen für eine Bindung zu verbessern, wurde zusätzlich der *Linker* zwischen His₆-Tag und Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme verändert, es wurde ein (HisAsp)₄-*Linker* eingebaut. Die DNA-Sequenzen der entsprechenden Phagen-Konstrukte sind im Anhang in Abbildung 9.1 und Abbildung 9.2 dargestellt.

Mit diesem Konstrukt wurde zunächst die Bindung an Ni-NTA-Material überprüft. Die entsprechenden Phagen binden an Ni-NTA-Material, allerdings kann eine unspezifische Bindung von Wildtyp-Phagen ohne His₆-Tag nicht gut genug unterbunden werden. Auch das Waschen des Materials mit niedrigen Imidazolkonzentrationen und das Binden der Phagen in 10 mM Imidazol konnten die unspezifische Wechselwirkung nicht verhindern. Der Einbau des Gastproteins Carrageenase (276 Aminosäuren) am N-Terminus und Infektionen mit den entsprechenden Phagen haben zwar gezeigt, daß die Phageninfektiosität nicht beeinträchtigt ist und rekombinante Phagen in diesem System nicht den entscheidenden Vorteil in der Selektion besitzen. Wegen der unspezifischen Bindung konnte jedoch keine Anreicherung stabilisierter Varianten erzielt werden.

3.7.3 Konstruktion eines Phagen mit N-terminalem Cystein zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten

Das Anfügen eines N-terminalen Cysteins an das G3P des Phagen sollte eine kovalente Wechselwirkung des Phagen mit der Trägermatrix, aktivierter Thiol-Sepharose, durch eine Disulfidbrücke ermöglichen. Die kovalente Verknüpfung des Phagen mit der Matrix ist robust und erlaubt daher ein intensives Waschen der Matrix zum Entfernen nichtgebundener Phagen. Basierend auf den existierenden Phagenkonstrukten wurde eine N-terminale Ala-Cys-Sequenz nach der Signalsequenz des G3P in das Phagengenom eingeführt. Dabei wird das Alanin als Erkennungssignal für die Signalpeptidase benötigt (Perlman und Halvorson, 1983). Auf die

Ala-Cys-Sequenz folgen *Linker* und die Restriktionsschnittstellen für den späteren Einbau von Gastproteinen. Die DNA-Sequenz dieses Konstrukts ist in Abbildung 3.75 angegeben.

5'-ATG AAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTTCCTTTCTATTCTCACTCC

Signalsequenz G3P Phage

(GCG)	(TGT)	TCC	GGG	GGA	GGA	CACGATCATGACCACGATCATGAC	GGC
Ala	Cys	Ser	Gly	Gly	Gly	(HD) ₄	Gly

TCTAGA AGTTCCGTT CTGCAG GGTTCTGAA GCTGAA.....-3'

<i>XbaI</i>	Ser	Ser	Gly	<i>PstI</i>	Gly	Ser	Glu	N1-G3P
-------------	-----	-----	-----	-------------	-----	-----	-----	--------

Abbildung 3.75: DNA-Sequenz des Phagenkonstrukts mit N-terminalem Cystein am G3P zur Selektion stabiler Proteinvarianten. Angegeben sind die DNA-Sequenzen der Signalsequenz des G3P, des N-terminalen Tags Ala/Cys, des *Linker*-Bereichs sowie der Restriktionsschnittstellen für die Klonierung von Gastproteinen, *XbaI* und *PstI*.

Der Titer entsprechender Phagenkonstrukte liegt im Bereich des Wildtyp-Phagen (etwa 10^{10} cfu/ml). Da die Phagen mit N-terminalem Cys kovalent an die Trägermatrix (Thiol-Sepharose) binden, kann das Waschen des Materials mit hochmolaren Salzpuffern erfolgen, ohne daß die Bindung des Phagen beeinträchtigt wird. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Phagen wurde deshalb Puffer unter Zusatz von 4 M NaCl, sowie Puffer mit 4 M GdmCl, pH 4,5 getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit dem GdmCl-Puffer erreicht. Die Fällung der Phagen wurde in Puffer mit niedrigem pH-Wert von 5,3 durchgeführt. Eine zusätzliche Reduktion der Phagen mit 20 mM DTT und anschließender Dialyse der Phagen oder mit 1 bzw. 10 mM TCEP vor der Bindung bei einem pH-Wert > 8 hatten keinen Effekt auf die Bindung an die Thiol-Sepharose. Es konnte lediglich eine Bindung von 0,1-0,2 % der Phagen (relativ zu den nichtgebundenen Phagen) erreicht werden, was einem Titer der eluierten Phagen von $\sim 10^5$ cfu/ml entspricht. Variation von Phagen- und Materialmenge haben gezeigt, daß die Kapazität der aktivierten Thiol-Sepharose nicht der limitierende Faktor für die Bindung ist. Auch der Einbau einer größeren Anzahl von Cysteinen am N-Terminus führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Bindung, stattdessen wirken sich mehrere aufeinanderfolgende Cysteine am N-Terminus negativ auf die Infektiosität des Phagen aus. Der Phagentiter ist in diesem Fall etwa eine Zehnerpotenz niedriger als bei nur einem Cystein. Phagen mit der N-terminalen Sequenz AlaCysArgCysArg (positive Ladungen zur Aktivierung des Cysteins) sind nicht infektiös. Inkubation bei 35 °C in Gegenwart von 500 mM Kaliumsulfat (Brocklehurst *et al.*, 1973; Oscarsson und Porath, 1989) führt zu einer deutlich verbesserten kovalenten Bindung von etwa 7 % der Phagen (relativ zu den nichtgebundenen Phagen). Dies entspricht einem Phagentiter von ca. 10^7 cfu/ml. Zusatz von GdmCl in niedriger Konzentration (1 M) zur besseren Zugänglichkeit des Cysteins hatte keinen Effekt auf die Bindung. Weitere Bindungsversuche wurden mit Phagen mit

eingebautem Gastprotein durchgeführt. Sowohl die Infektiosität als auch die Bindung war bei den Phagen mit Gastprotein genauso hoch wie beim entsprechenden Phagen ohne Insert.

Für die Bindung an die Thiol-Sepharose und die Elution der Phagen wurde das in 2.9.2 beschriebene Protokoll verwendet. Mit diesem Protokoll konnte eine Bindung von etwa 1 %-10 % der Phagen im Vergleich zum Durchbruch erreicht werden. Der Phagentiter der eluierten Phagen betrug damit etwa 10^6 - 10^7 cfu/ml. Die Bindung der Phagen muß allerdings noch deutlich verbessert werden, um eine ausreichend große Phagenanzahl für Selektionen zu gewährleisten.

3.7.4 Selektion stabilisierter β -Lactamase-Varianten im Selektionssystem mit N-terminalem Cystein-Tag am G3P

Um die Anwendbarkeit des Systems zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten zu überprüfen, wurden mittels fehlerbehafteter PCR zwei β -La-Bibliotheken erstellt. Die entsprechenden Phagenbibliotheken wurden zunächst an die aktivierte Thiolsepharose gebunden und erst anschließend der Proteolyse mit Chymotrypsin unterworfen. Dazu wurde ein Ansatz nach der Bindung über Nacht in einen Kontrollansatz und den eigentlichen Proteaseansatz aufgeteilt. Nach Proteolyse, Herauswaschen ungebundener Phagen und Elution wurde dann mit Phagen aus beiden Ansätzen ein Infektionstest zur Bestimmung der Überlebensrate durchgeführt. Mit dem Proteaseansatz wurde dann eine *E. coli* TG1-Kultur zur Phagenpropagation infiziert (2.9.4).

Für die Zufallsmutagenese der β -Lactamase (ohne Disulfidbrücke) wurde eine entsprechende Selektion über fünf Selektionsrunden in Gegenwart von 20 μ g/ml Ampicillin durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur von 45 °C schrittweise auf 55 °C erhöht. Die Konzentration an Chymotrypsin wurde von 0,25 μ M bis 2,5 μ M variiert. Nach fünf Selektionsrunden wurden jeweils sieben Klone sequenziert. Die Ergebnisse der Selektion sind in Tabelle 3.22 aufgeführt.

Tabelle 3.22: Varianten aus der Zufallsmutagenese der disulfidfreien β -La (C77A/C123A) mit folgender Selektion als N-terminales G3P-Fusionsprotein im alternativen *Proside*-System..

Position	Variante						
	β -La	E1	F1	F2	F3	F4	F5
49	Leu	Met					
77	Ala				Val		
120	Arg					Gly	
224	Ala			Val			Val
230	Phe			Val			
275	Arg		Leu				

Variante E1 (7x selektiert) wurde in Bibliothek 1 identifiziert, Varianten F1 (1x selektiert), F2 (1x selektiert), F3 (1x selektiert), F4 (1x selektiert) und F5 (1x selektiert) stammen aus Bibliothek 2.

In Bibliothek 1 wurde ausschließlich eine Variante selektiert, die an Position 49 die Mutation Leu→Met besitzt. Diese Variante konnte insgesamt 7x identifiziert werden. In Bibliothek 2 konnte eine Vielzahl an Varianten gefunden werden, diese Bibliothek ist noch nicht konvergiert. Sowohl die stark stabilisierende Mutation R275L, als auch die ebenfalls aus den vorigen Selektionen bekannte Mutation A224V, waren in der Bibliothek vorhanden. Dies ist ein Beweis dafür, daß die Selektion stabilisierter Proteinvarianten tatsächlich erfolgreich war. Neben den bekannten Mutationen sind noch drei neue Mutationen aufgetreten. An Position 77 wurde das Alanin (Disulfidbrückenersatz) zum Valin mutiert. Die Mutation zum Valin deutet ebenfalls auf eine Stabilisierung hin, da in der Selektion des disulfidfreien G3P bzw. beim Ersatz der Disulfidbrücken im pankreatischen Trypsininhibitor (BPTI) (Liu *et al.*, 1997) die Kombination Val / Ala als stabilisierende Substitution gefunden wurde. Das modifizierte Selektionssystem zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten konnte damit erfolgreich zur Stabilisierung der β -Lactamase angewendet werden.

Als zweites Gastprotein wurde ein chimäres HisF-Protein in den Phagen eingebaut. Durch fehlerbehaftete PCR wurden zwei unabhängige Bibliotheken erstellt. Mit den entsprechenden Phagenbibliotheken wurde eine Selektion auf stabilisierte Proteinvarianten durchgeführt. Bei dieser Selektion wurden jedoch rekombinante Phagen identifiziert, die in diesem Fall jedoch nicht aufgrund eines Infektionsvorteils angereichert werden sollten, sondern aufgrund einer besseren Bindung in Kombination mit einer höheren Proteaseresistenz im *in vitro*-Selektionsschritt.

Für eine breitere Anwendbarkeit des Systems muß also vor allem die Bindung der Phagen an die Affinitätsmatrix deutlich verbessert werden. Ein Ansatz dazu wäre die Kombination der kovalenten Bindung über das Cystein mit elektrostatischen Wechselwirkungen durch polyionische Peptidabschnitte auf Phagenseite und auf Seite der Trägermatrix (Richter, 2001). Das neue Selektionssystem umgeht auf jeden Fall die Probleme niedriger Infektiosität bei großen Gastproteinen und sollte nach weiterer Optimierung eine Alternative zur *Proside*-Methode darstellen.

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Weiterentwicklung der *Proside*-Selektionsmethode im Hinblick auf die Stabilisierung großer Proteine

4.1.1 Substitution der Disulfidbrücken im G3P* N1N2-Fragment

Proside ist eine Selektionsmethode für stabilisierte Proteinvarianten. Dabei wird eine erhöhte Proteaseresistenz stabilisierter Proteinvarianten mit der Infektiosität filamentöser Phagen verknüpft (Sieber *et al.*, 1998). *Proside* wurde bereits für die Stabilisierung verschiedener kleiner Proteine erfolgreich angewendet (Sieber *et al.*, 1998, Martin und Schmid, 1998; Martin *et al.*, 2001; Wunderlich *et al.*, 2005b) und kann daher als eine sehr leistungsfähige Methode zur Stabilisierung von Proteinen beurteilt werden. Limitiert wird die Methode jedoch zum einen durch die Größe des eingebauten Gastproteins und zum anderen durch potentiell inkorrekte Disulfidverbrückungen zwischen Cysteinen des G3P und des Gastproteins, wodurch die Infektiosität der Phagen deutlich reduziert wird.

Die Substitution der Disulfidbrücken des G3P erfolgte ebenfalls durch *in vitro*-Evolution. Für die Erstellung der Bibliotheken ergeben sich zwei limitierende Faktoren. Zum einen muß die Bibliothek groß genug sein, damit alle Mutanten mit 99%iger Wahrscheinlichkeit vertreten sind (Clarke und Carbon, 1976). Zum anderen muß beachtet werden, daß bei der Erstellung der Bibliothek mindestens 50 % der Phagen die Matrizen-DNA enthalten. Die gleichzeitige Randomisierung aller sechs Cysteinpositionen im G3P* N1N2-Fragment unter Gewährleistung einer ausreichend großen Bibliothek ist daher schwierig, denn bei Bibliotheken mit 10^7 - 10^8 verschiedenen Varianten ist bereits die Transformationseffizienz von *E. coli* limitierend. Ein gleichzeitiger Ersatz aller Disulfidbrücken war auch wegen der extremen Destabilisierung des G3P durch den Verlust von drei Disulfidbrücken nicht möglich. Deshalb wurden die Disulfidbrücken einzeln ersetzt und optimiert.

Trotz eines sorgfältigen Ausschlusses der Cysteine aus Matrizen-DNA und Bibliotheken konnte ein wiederholtes Auftreten von Phagen mit disulfidverbrücktem G3P nicht verhindert werden. Dies zeigt die enorme Effizienz des *Proside*-Selektionssystems. Minimalste Verunreinigungen der Bibliotheken mit disulfidhaltigen Phagen reichen aus, um alle anderen Phagen ohne die entsprechende Disulfidbrücke zu verdrängen. Der Vorteil der Phagen mit Disulfidbrücken lag dabei vor allem in der thermodynamischen Stabilität des G3P und damit in der erhöhten Proteaseresistenz, also im *in-vitro*-Schritt. In der *in-vivo*-Selektion hatten diese Phagen ebenfalls einen Vorteil, da sie etwa um eine Zehnerpotenz infektiöser sind.

Insgesamt konnte durch die Optimierung der Aminosäurepaare, welche die Disulfidbrücken ersetzen, nur ein geringer Teil des enormen Stabilitätsverlusts kompensiert werden, der durch den Bruch der kovalenten Verknüpfungen verursacht worden war. Entscheidend für die Generierung stabiler, disulfidfreier Varianten von G3P war es daher, zufällige Mutationen in das Protein einzuführen und die besten zu selektieren. Um zufällige Mutationen in das

Phagengenom einzuführen, gibt es viele verschiedenen Methoden (Barbas *et al.*, 2001). Während die vier ursprünglichen stabilisierenden Mutationen (in 3SS-G3P*) nach Vermehrung der Phagen im Mutator-Stamm XL1Red selektiert wurden, wurde hier fehlerbehaftete PCR zur Mutagenese verwendet. Fehlerbehaftete PCR hat den Vorteil, daß nur das gewünschte Gen mutagenisiert wird, wohingegen bei der XL1Red-Mutagenese das gesamte Phagengenom betroffen ist und damit viele Phagen mit Mutationen in den essentiellen Phagen-Genen entstehen und in der Bibliothek verloren gehen. Die Mutagenese durch fehlerbehaftete PCR wird außerdem durch zufällige Mutationen während der Phagenpropagation ergänzt. Einige (besonders stark stabilisierende) Mutationen konnten dabei in unterschiedlichen Bibliotheken identifiziert werden. Dies läßt darauf schließen, daß die Mutationsrate hoch genug war und eventuell bestimmte Positionen bevorzugt mutiert wurden (Zugänglichkeit der DNA für die Polymerase, bevorzugte Basenpaarungen etc., Wong *et al.*, 2006). Ferner konnten in allen Bibliotheken stille Mutationen gefunden werden, die ebenfalls auf eine hohe Mutationsrate schließen lassen. Eingeschränkt ist die Zufallsmutagenese jedoch dadurch, daß fast nur Ein-Basen-Austausche stattfinden und so nur eine eingeschränkte Zahl an alternativen Resten zugänglich ist. Für vielversprechende Positionen ist es daher besonders wichtig, die optimale Ersatzamino-säure durch die vollständige Randomisierung dieser Position zu ermitteln.

In der Zufallsmutagenese von 2SS-G3P* wurden neun verschiedene *second-site*-Mutationen selektiert, wobei die Mutationen R29W und N39K in der N1-Domäne den größten Beitrag zur Stabilität leisteten (3.1.10). Besonders viele Mutationen wurden in der N1-Domäne selektiert. Sie war durch den Verlust der Disulfidbrücke C46-C53 an der Domänengrenzfläche besonders stark destabilisiert, deshalb führt eine Stabilisierung in dieser Domäne zur Optimierung des instabilsten Teils im Protein. Dieses Phänomen der Stabilisierung des schwächsten Glieds konnte bereits bei der Selektion von 3SS-G3P* festgestellt werden (Martin und Schmid, 2003b).

Die Substitution der dritten Disulfidbrücke C7-C36 (in N1) konnte nur durch ortsgerichtete Mutagenese erreicht werden, nachdem das Protein durch die beiden „Schlüsselmutationen“ R29W und N39K schon so stark stabilisiert war, daß ein funktionales 0SS-G3P* und damit infektiöse Phagen vorlagen. Das schließlich selektierte 0SS-G3P* war stabiler als das disulfidverbrückte Wildtyp-Protein. Durch die neun *second-site*-Mutationen konnte also der Verlust von drei Disulfidbrücken überkompensiert werden, und die Kombination aller selektierten Mutationen (insgesamt 14 *second-site*-Mutationen) führte zu einer 0SS-G3P*-Variante, die um 19 °C gegenüber dem disulfidverbrückten Wildtyp-Protein stabilisiert ist.

Die Anwendung des disulfidfreien G3P* erfordert die Infektiosität, auch als Fusion mit cysteinhaltigen Gastproteinen. Da *Proside* im *in vivo*-Selektionsschritt nichtinfektiöse Phagen eliminiert, müssen alle selektierten Phagen infektiös sein. Die Infektiosität ist jedoch bei den Phagen mit reduzierter Disulfidbrückenanzahl im G3P verringert. Ein Vergleich der Infektiositäten der Phagen mit 3SS-G3P* und 0SS-G3P* mit einem cysteinhaltigen

Gastprotein (z.B. Carrageenase) zeigt eine deutlich höhere Infektiosität im Phagen mit disulfidfreiem G3P* und damit einen Erfolg für die Anwendbarkeit der Methode.

4.1.2 Selektion stabilisierter Varianten der TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli*

Die TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli* besteht aus 263 Aminosäuren und diente hier als Modellprotein für die Stabilisierung großer Proteine mit Hilfe des *Proside*-Systems. Der Einbau großer Proteine zwischen die N2- und die CT-Domäne des G3P vermindert die Infektiosität der Phagen. Die Präparation von einzelsträngiger DNA zeigt, daß zwar Phagen produziert werden, diese aber kaum infektiös sind. Der *Linker*-Bereich zwischen N2- und CT-Domäne ist für die Infektiosität offenbar wichtig. Bereits beim *Selectively infective phage* (SIP) konnte ein Einfluß der Größe des eingebauten Gastproteins festgestellt werden (Jung *et al.*, 1999).

Möglicherweise stört ein großes Gastprotein den Export des G3P. Das G3P wird über den Sec-Weg exportiert, d.h. das nicht gefaltete Fusionsprotein aus G3P und Gastprotein wird posttranslational exportiert und faltet erst im Periplasma. Mögliche Folgen dieses Exports können die Aggregation des Gastproteins im Periplasma oder Cytoplasma (Deng *et al.*, 1994; Jung und Plückthun, 1997), eine inkorrekte Disulfidverbrückung (Brinkmann *et al.*, 1995), Probleme beim Export bestimmter Gastproteinsequenzen (Rodi *et al.*, 2002) oder der Abbau durch periplasmatische oder cytoplasmatische Proteasen sein (Steiner *et al.*, 2006). Der Export des Fusionsproteins über den SRP-Weg würde einen cotranslationalen Transfer in das Periplasma ermöglichen und damit die korrekte Faltung des Fusionsproteins begünstigen. Durch eine Veränderung des Exportwegs konnte das konventionelle *phage display* etwa 1000 x verbessert werden (Steiner *et al.*, 2006). Der Transport über den SRP-Weg wurde dabei durch den Einbau der DsbA-Signalsequenz anstelle der Signalsequenz des G3P induziert. Zu beachten ist jedoch, daß im konventionellen *phage display* das Gastprotein an der Spitze des G3P eingebaut wird, die Situation also eine andere ist als im *Proside*-System. Beim Gastprotein zwischen N2- und CT-Domäne können noch andere Faktoren eine Rolle spielen, wie z.B. die Entfernung zwischen N- und C-Terminus des Gastproteins und damit die Nähe von CT- und N2-Domäne zueinander und die Länge des Gly-reichen *Linker*-Bereichs zwischen N2- und CT-Domäne.

Der Einbau der DsbA-Signalsequenz führte im Falle des Phagen mit β -Lactamase als Gastprotein zu keiner signifikanten Erhöhung der Infektiosität (Daten nicht gezeigt). Die Infektiosität wurde auch im Phagen mit einem auf acht Aminosäuren verkürzten *Linker* (Martin *et al.*, 2003a) und im Phagen mit dem 52 Aminosäuren umfassenden wildtypischen *Linker* zwischen N2- und CT-Domäne verglichen, wobei im Wildtyp-Phagen eine um zwei Zehnerpotenzen höhere Infektiosität erreicht werden konnte. Durch die Verwendung von *E. coli* TG1-Zellen anstelle von *E. coli* XL1Blue zur Infektion konnte die Infektiosität nochmals erhöht werden (Phagentiter $\sim 10^8$ cfu/ml).

Die *Proside*-Selektion wird zum einen durch die Stabilität des G3P, zum anderen durch die Stabilität der Protease limitiert. Da bei den Selektionen die stabilisierte Variante des G3P

(G3P*) mit einem Schmelzpunkt der N2-Domäne von 61,8 °C verwendet wurde, ist der Temperaturbereich für die Selektion durch die Stabilität von Chymotrypsin auf $T \leq 58$ °C limitiert. Bei einer Stabilität der Wildtyp- β -Lactamase von 50,8 °C war damit eine Selektion stabilisierter Proteinvarianten nur in begrenztem Rahmen möglich, weil bereits bei einer Stabilisierung von etwa 6 °C die Grenze der Erhöhung des Selektionsdrucks erreicht war. Hier war es besonders hilfreich, das Ausgangsprotein durch Eliminierung der Disulfidbrücke C77-C123 zu destabilisieren und so den Selektionsbereich zu erweitern. Tatsächlich konnten so weitere stabilisierende Mutationen selektiert werden, die auch im disulfidverbrückten Protein zur Proteinstabilität beitrugen. Durch die Entfaltung des Proteins mittels chemischem Denaturierungsmittel GdmCl und damit einer Veränderung des Selektionsdrucks (in diesem Fall ist nicht die thermische Stabilität, sondern die thermodynamische Stabilität entscheidend) konnten neue stabilisierende Mutationen selektiert werden, von denen die Mutation R275L den größten Beitrag zur Stabilität lieferte.

Auch im Falle der β -La-Selektion wurden immer wieder stille Mutationen an Positionen gefunden, die für die β -La-Aktivität entscheidend sind. Dies zeigt auch im diesem Fall, daß die Mutageneserate ziemlich hoch war. Die β -La-Selektion erfolgte zusätzlich zur Selektion auf Stabilität in Gegenwart von Ampicillin und damit auch auf Aktivität des Gastproteins. Neben den gefundenen β -La-Varianten ist deshalb noch von einer Vielzahl von eventuell stabilisierten, jedoch nicht mehr aktiven β -La-Varianten auszugehen. Eine vergleichende Selektion ohne den Aktivitätsselektionsdruck wäre für einen Vergleich interessant gewesen, konnte jedoch nicht erfolgreich durchgeführt werden.

4.1.3 Entwicklung eines alternativen Systems zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten

Beim Versuch der Selektion stabilisierter Varianten großer Proteine (z.B. Carrageenase, β -Lactamase) trat neben der niedrigen Infektiosität regelmäßig das Problem des Verlusts der inserierten Gastproteine auf. Die entstehenden rekombinierten Phagen waren sehr proteaseresistent und dominierten deshalb oft innerhalb von nur einer Runde die Phagenbibliothek. Grund für diesen Verlust ist vermutlich illegitime homologe Rekombination (Ehrlich *et al.*, 1993; Kuzminov, 1999) kombiniert mit einer niedrigen Infektiosität der Phagen mit Gastprotein. Trotz Verwendung des RecA-defizienten Stammes *E. coli* XL1Blue bzw. TG1 konnte die Rekombination im Phagen nicht effizient genug unterdrückt werden. Diesem bereits aus der Selektion mit kleineren Proteinen bekannten Problem wurde bislang mit dem regelmäßigen Entfernen der rekombinanten Phagen aus der Bibliothek durch Genamplifikation des Gastproteins und Neukonstruktion der Bibliothek begegnet. Im Falle der größeren Gastproteine war jedoch meist nach bereits einer Selektion kein Gastproteingen mehr amplifizierbar. Selbst wenn Rekombinationsereignisse extrem selten sind, führen sie dennoch zu einem immensen Vorteil: im *in vitro*-Schritt zu einer starken Zunahme der Proteaseresistenz und im *in vivo*-Schritt zu einer starken Erhöhung der Infektiosität. Zusammen führen diese beiden Effekte dazu, daß sich einzelne rekombinierte Phagen sehr schnell in der Selektion durchsetzen. In ähnlicher Weise konnten sich auch

geringste Mengen an Phagen mit intakten Disulfidbrücken im G3P sehr rasch gegen alle Phagen ohne Disulfidbrücken durchsetzen.

Ein alternatives System zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten sollte deshalb im Hinblick auf die Anwendbarkeit für große Proteine etabliert werden. Aus Arbeiten von Heinis *et al.* (2001) war bekannt, daß der Einbau großer Gastproteine an der Spitze des G3P, also am N-Terminus des G3P, keinen Einfluß auf die Infektiosität der Phagen hat. Der Phage mit stabilisiertem G3P (G3P*) wurde deshalb am N-Terminus so modifiziert, daß ein Histidin-Aspartat-*Linker* und zwei zusätzliche Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme eingebaut wurden. Zudem wurde ein N-terminaler *Tag* codiert, der eine Affinitäts Selektion ermöglichen sollte. In diesem Fall wurde die N-terminal angefügte Gastproteinbibliothek ebenfalls mit einer Protease inkubiert, um instabile Gastproteinvarianten zu zerstören. Die Selektion erfolgt hier jedoch nicht über eine Kombination von Stabilität und Infektiosität der Phagen, sondern über die Kombination von Stabilität und Affinität des N-terminal angefügten *Tags* zu einer entsprechenden Affinitätsmatrix. Die Versuche mit β -Lactamase, Carrageenase und HisF zeigten, daß die Infektiosität der Phagen mit N-terminalem Gastprotein tatsächlich im Vergleich zum Wildtyp-Phagen kaum beeinflußt war.

Die Selektion selbst erfordert, daß der *Tag* am Phagen zugänglich ist und mit hoher Affinität an das Material bindet. Außerdem dürfen die Phagen nicht unspezifisch an das Affinitätsmaterial binden. Von den verschiedenen untersuchten *Tags* hat sich nur ein N-terminales Cystein als tauglich erwiesen. Es ermöglicht eine kovalente Anknüpfung des Phagen an Thiol-Sepharose. In diesem Fall konnten nicht spezifisch gebundene Phagen durch Waschen mit hohen Salzkonzentrationen entfernt werden und die selektierten Phagen dann mit Reduktionsmittel eluiert werden. Problematisch ist hier jedoch noch der geringe Bindungsgrad der Phagen - ein Problem, das bislang nicht gelöst werden konnte und auch im traditionellen *phage display* limitierend ist. Für die β -Lactamase konnte jedoch gezeigt werden, daß tatsächlich mit diesem Verfahren eine Selektion auf stabilisierte Proteinvarianten möglich ist. Obwohl in diesem Fall zwar anhand der selektierten Mutationen A224V und R275L auf den Stabilisierungserfolg geschlossen werden konnte, bleibt bislang die Frage nach der Vermeidung der homologen Rekombination offen, da durch die Selektion in Gegenwart von Ampicillin rekombinante Phagen eliminiert wurden. Für die weitere Anwendung zur Stabilisierung großer Proteine müssen die Bindungseffizienz erhöht und die Frage nach dem Verlust des Gastproteins geklärt werden.

4.2 Thermodynamische und strukturelle Charakterisierung des stabilisierten disulfidfreien Gen-3-Proteins filamentöser Phagen

4.2.1 Substitution der Disulfidbrücken im G3P - Thermodynamische Charakterisierung

Das Gen-3-Protein filamentöser Phagen besteht, wie bereits erwähnt, aus den beiden N-terminalen Domänen N1 und N2 und der hydrophoben C-terminalen Domäne CT. Die beiden N-terminalen Domänen können als lösliches Zweidomänenprotein exprimiert werden. Sowohl für das N1N2-Fragment des filamentösen Phagen fd als auch für das des Phagen M13 konnte die Kristallstruktur gelöst werden (Lubkowski *et al.*, 1998; Lubkowski *et al.*, 1999; Holliger *et al.*, 1999). Die hufeisenförmige Struktur zeigt eine Kontaktfläche der Domänen von 1000 Å² (Lubkowski *et al.*, 1999). Da sich die Bindungsstelle für den sekundären Rezeptor TolA im Bereich der Domänengrenzfläche befindet und die Bindung an den Pilus der *E. coli*-Zelle zur Öffnung der Domänen führt (Eckert *et al.*, 2005), ist die Domänenendissoziation von zentraler Bedeutung für den Infektionsprozeß. Stabilitätsuntersuchungen des G3P-Wildtyp-Proteins haben einen sequentiellen Verlauf der Entfaltung des N1N2-Fragments bestätigt (Martin und Schmid, 2003b). In einer ersten Reaktion erfolgt die Domänenendissoziation gekoppelt mit der Entfaltung der labileren N2-Domäne, die zweite Reaktion repräsentiert die Entfaltung der stabileren N1-Domäne.

Thermische Entfaltungsübergänge der Varianten mit substituierter Disulfidbrücke in der N2-Domäne zeigen den gleichen Entfaltungsmechanismus wie das Wildtyp-Protein. Der stabilste Ersatz der Disulfidbrücke an dieser Position ist eine Val / Ala-Kombination. Die hydrophobe Umgebung der Disulfidbrücke (Phe134, Phe185) könnte diesen Ersatz begünstigen. Interessanterweise fanden Liu *et al.* (1997) mittels ortsgerichteter Mutagenese für die Disulfidbrücke C30-C51 im pankreatischen Trypsininhibitor (BPTI) ebenfalls ein Ala / Val-Paar als stabilsten Disulfidbrückenersatz.

Der Verlust der Disulfidbrücke C46-C53 in der N1-Domäne verringert die Stabilität dieser Domäne so stark, daß sich der Entfaltungsmechanismus signifikant ändert. Die Entfaltung von G3P* verläuft jetzt als ein hochkooperativer Prozeß, weil nach der Domänenendissoziation sowohl die N2- als auch die N1-Domäne instabil ist und spontan entfaltet. Der stabilste Ersatz der Disulfidbrücke C46-C53 wurde durch die Kombination Ile / Val erreicht. Ein Ala / Val-Paar wurde auch selektiert, allerdings war die Variante mit der Kombination Ile / Val stabiler. Dies zeigt, daß es kein generelles Prinzip für den optimalen Ersatz von Disulfidbrücken gibt. Die lokale Umgebung der Disulfidbrücke ist dabei ebenso wichtig wie die Rückgratkonformation und die Konformation der Seitenketten (Bhattacharyya *et al.*, 2004). Die zusätzliche Expression und Charakterisierung der isolierten N1-Domänen mit den entsprechenden Mutationen ermöglichte es, die Stabilisierung der N1-Domäne unabhängig von Domänenendissoziation und Entfaltung von N2 zu analysieren und so Effekte molekular zuzuordnen. Die Ergebnisse bestätigen, daß eine labile N1-Domäne im N1N2-Fragment vermutlich durch die Domänenwechselwirkungen stabilisiert werden kann.

Die Analyse der G3P-Varianten mit substituierten Disulfidbrücken zeigt, daß selbst ein optimaler Ersatz von Disulfidbrücken nur einen kleinen Teil der Destabilisierung durch den Disulfidbrücken-Verlust kompensieren kann.

4.2.2 Durch second-site-Mutationen kann der Verlust von drei Disulfidbrücken überkompensiert werden

In den beiden Selektionen nach Zufallsmutagenese konnten viele *second-site*-Mutationen in beiden Domänen von G3P* identifiziert werden. Der Vergleich des stabilisierten disulfidfreien G3P* mit dem disulfidverbrückten Wildtyp-Protein zeigte, daß die 14 selektierten *second-site*-Mutationen den Stabilitätsverlust aus dem Ersatz der drei Disulfidbrücken weit überkompensierten. Dies konnte durch die Verbesserung nicht-kovalenter Wechselwirkungen, insbesondere an wenigen „Schlüsselpositionen“, erreicht werden. In Anbetracht des enormen Stabilitätsbeitrags durch Disulfidbrücken (Thornton, 1981) zeigt dies die Funktionalität des *Proside*-Systems auf der einen Seite und die verschiedenen Möglichkeiten der Stabilisierung eines Proteins auf der anderen Seite. Diese Flexibilität ist in der natürlichen Evolution für die Anpassung an den herrschenden Selektionsdruck wichtig, in der *in vitro*-Evolution bietet sie die Möglichkeit, Proteine gezielt bestimmten Erfordernissen anzupassen (*protein engineering*). Eine mögliche Kompensation des Stabilitätsverlusts nach Eliminierung von Disulfidbrücken ist für die Entwicklung cytoplasmatisch wirksamer Antikörper von besonderer Bedeutung (Röthlisberger *et al.*, 2005).

Um die Additivität der stabilisierenden Beiträge der mutierten Aminosäuren umfassend beurteilen zu können, wäre die Analyse mittels Mutationszyklen wichtig gewesen. Aufgrund der Komplexität des Systems aus zwei Domänen, bei dem sich der Mechanismus der Entfaltung je nach betrachteten Mutationen ändert und damit keine thermodynamische Analyse mehr zuläßt, ist die Untersuchung von Mutationszyklen jedoch nicht möglich. Darüberhinaus würde die Analyse von 14 Mutationen allein auf der Ebene von paarweisen Beziehungen zu 196 Doppelmutanten führen. Einzelne Kombinationsmutanten erlaubten es trotzdem, erste Einblicke in energetische Prinzipien der Stabilisierung zu erlangen. Analytische OSS-G3P*-Varianten lassen die Evaluation der stabilisierenden Beiträge in unterschiedlichem Hintergrund zu. Aufgrund der großen Anzahl an Mutationen ist jedoch keine erschöpfende Analyse möglich.

Die Betrachtung der Einzelvarianten im OSS-G3P* zeigt den großen Beitrag der Mutation R29W in der N1-Domäne. Alle Einzelvarianten zeigen eine hochkooperative Entfaltungsreaktion, so daß die Beiträge der Stabilisierung von N1 und N2 nicht zu trennen sind. In diesem Fall dienen die erhaltenen Schmelztemperaturen als qualitatives Vergleichsmerkmal der verschiedenen Domänen, da eine thermodynamische Analyse nicht möglich ist. Die Schmelztemperaturen beziehen sich damit auf die Entfaltung des gesamten N1N2-Fragments gekoppelt mit der Domänenendissoziation. Es ist dabei von einer thermodynamischen Kopplung der Domänen auszugehen. Die Kombinationsvarianten zeigen die weitgehende Additivität der

stabilisierenden Beiträge der einzelnen Mutationen und den Effekt auf die Domäneninteraktionen.

Der extrem hohe Stabilitätsbeitrag der Disulfidbrücken zeigt sich darin, daß das disulfidfreie Referenzprotein 0SS-G3P* nur durch die Domänenwechselwirkungen stabil ist. Sobald die Domänen dissoziieren, entfalten beide Domänen. Daran wird außerdem deutlich, daß die Disulfidbrücken zwar für die Stabilität der einzelnen Domänen, nicht jedoch für die Interdomänenwechselwirkungen wichtig sind. Alle Einzelmutationen, auch die extrem stabilisierende R29W Mutation, ändern nichts am Entfaltungsmechanismus. Beide Domänen entfalten, sobald sie dissoziieren. Die Entfaltung der stabilisierten Varianten zieht jedoch nicht mehr so stark am Gleichgewicht, so daß der T_m -Wert dieser Varianten höher ist. Erst die Kombination der beiden Mutationen R29W und N39K in 0SS-N1 stabilisiert das Protein so stark, daß N1 ohne N2 bis 63 °C stabil ist. Die Entfaltung dieser Variante ist wieder zweiphasig.

Die kinetische Analyse des Faltungsmechanismus verschiedener 0SS-G3P*-Varianten zeigte, daß sich trotz des Verlusts von drei Disulfidbrücken der Mechanismus nicht verändert. Dies ist mit der in der Selektion vorausgesetzten Funktionalität entsprechender G3P-Varianten zu erklären. Nur infektiöse Phagen können die *in vivo*-Selektion im *Proside*-System überleben. Da die Infektiosität eng mit dem Faltungsmechanismus des G3P gekoppelt ist (Martin und Schmid, 2003c) und die Domänen dissoziationsreaktion für die Infektion essentiell ist (Eckert *et al.*, 2005), ist ein konservierter Faltungs- bzw. Entfaltungsmechanismus für die komplexen Konformationsänderungen während der Pilus- und TolA-Bindung von Vorteil. Die N1-Domäne faltet extrem schnell, sowohl im disulfidverbrückten G3P* als auch in den 0SS-G3P*-Varianten, wobei die Rückfaltung in Abwesenheit der Disulfidbrücken sogar deutlich schneller erfolgt. Dies könnte darauf hin deuten, daß die Disulfidbrücken wichtige konformationelle Kettenumlagerungen bei der Faltung etwas behindern (Wedemeyer *et al.*, 2000). Die N1-Domäne verhält sich wie andere kleine Proteine. Sie faltet gemäß dem Zweizustandsmodell sehr schnell im ms-Bereich (Jackson und Fersht, 1991; Jackson, 1998; Schindler *et al.*, 1995). Im N1N2-Fragment führt nach der Faltung der einzelnen Domänen erst die Domänenassoziation zum nativen Zustand des Proteins. Dies charakterisiert Zweidomänenproteine, bei denen die isolierten Einzeldomänen nicht stabil sind (Rudolph *et al.*, 1990). Wie im disulfidverbrückten G3P* ist auch im disulfidfreien N1N2-Fragment die N1-Domäne isoliert stabil gefaltet, die Faltung der N2-Domäne jedoch an die Domänenassoziation gekoppelt, ein Mechanismus, der für andere Zweidomänenproteine beobachtet wird (Martin und Schmid, 2003c; Garel, 1992). Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Analyse des Faltungsmechanismus solcher G3P*-Varianten, die in Gleichgewichtsexperimenten einen hochkooperativen Entfaltungsübergang zeigen.

4.2.3 Die Analyse der Kristallstruktur gibt Aufschluß über die stabilisierenden Effekte

Um den Effekt der stabilisierenden Mutationen auf struktureller Basis zu verstehen, wurde das stabilisierte 0SS-G3P* (Variante 23, Tabelle 3.2) kristallisiert und die Struktur gelöst (R. Jakob, Universität Bayreuth). Ein Vergleich mit den bereits bekannten Kristallstrukturen des G3P von M13- bzw. fd-Phagen (Holliger *et al.*, 1999; Lubkowski *et al.*, 1998) zeigt eine Verdrehung der Domänen relativ zueinander.

Die relative Orientierung der Domänen in M13- und fd-G3P führt zu einer unterschiedlichen Anordnung der an der Domäneninteraktion beteiligten Reste. Dabei gehen einige Reste verschiedene Wechselwirkungen ein (E50, Y102). In beiden Strukturen ist jedoch eine verborgene Salzbrücke zwischen den Aminosäureresten R29 und E50 (M13) bzw. K22 und E50 (fd) an der Domänengrenze lokalisiert. Diese Wechselwirkung wird durch den Ersatz der Disulfidbrücke C46-C53 und die stabilisierende Mutation R29W zerstört und scheint daher ungünstig für die Stabilität des Proteins zu sein. Die verschiedenen Möglichkeiten der Interdomänenwechselwirkungen sind ein Hinweis für die Flexibilität des Proteins in diesem Bereich. Die Unterschiede in den Konformationen von M13- und fd-G3P sind daher vermutlich nicht auf die zwei unterschiedlichen Mutationen, sondern vielmehr auf die „Momentaufnahme“ des dynamischen G3P im Kristall zurückzuführen. Diese Flexibilität zeigt die Bedeutung der Gelenkregion für die Funktion, d.h. die Infektiosität des entsprechenden Phagen. Der Vergleich der Kristallstrukturen ermöglicht damit einen Einblick, kann jedoch keine erschöpfende Auskunft über die stabilisierenden Effekte geben.

Die Mutationen mit dem größten Effekt auf die Proteinstabilität sind im Bereich der Domänengrenzfläche lokalisiert. Die Mutationen R29W in N1 und N138G in N2 befinden sich in unmittelbarer Nähe der Disulfidbrücke C46-C53, die im 0SS-Protein zu einem Ile / Val-Paar ausgetauscht wurde. Die Mutation R29W stabilisiert nicht nur die N1-Domäne, sondern verbessert auch die Domäneninteraktionen. Dies wird besonders beim Vergleich der Stabilitäten des 3SS-G3P* in Gegenwart oder Abwesenheit der Mutation R29W deutlich. Die Stabilität und Faltung des 3SS-G3P* mit der Mutation R29W bestätigt die enorme Stabilisierung dieser Mutation auch in Gegenwart der Disulfidbrücke (Stöckl, 2005). Hier verschiebt die R29W Mutation beide Übergänge, die Domänenöffnung und die Entfaltung von N1, zu höheren Temperaturen. Im 0SS-G3P* ist eine getrennte Analyse des Effekts der Mutation R29W nicht möglich, da die Entfaltung beider Domänen mit der Domänenöffnung gekoppelt ist. Die gesamte Stabilisierung durch die R29W Mutation beträgt hier jedoch fast 30 kJ/mol. Dieser enorm hohe Wert zeigt, daß Trp29 zusätzlich günstige Wechselwirkungen mit Ile46 und Val53 eingeht, welche die Disulfidbrücke C46-C53 ersetzen. Die R29W Mutation stabilisiert 0SS-G3P* also auf dreifache Weise: Sie ersetzt eine vergrabene geladene Gruppe durch eine ungeladene, sie verbessert die lokale Packung im Bereich der Aminosäuren, welche die C46-C53 Disulfidbrücke ersetzen, und sie stärkt die Domäneninteraktionen. Die N138G Mutation auf der anderen Seite der Domänengrenzfläche in N2 stabilisiert lokal einen β -Turn und verbessert ebenfalls die Domänenwechselwirkungen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Prinzipien der Stabilität von Zweidomänenproteinen, bei denen neben den Interaktionen in den individuellen Domänen vor allem die Interdomänenwechselwirkungen die Stabilität bestimmen. Eine mit der Domänenendissoziation gekoppelte Entfaltung der labileren Domäne ist aufgrund starker Domäneninteraktionen in vielen Zweidomänenproteinen zu beobachten (Privalov, 1982; Wenk und Jaenicke, 1999).

Um die Prinzipien der thermodynamischen Stabilität von Proteinen zu verstehen, ist ein Vergleich homologer Proteine aus mesophilen und thermophilen Organismen aufschlußreich. Proteine aus thermophilen Organismen zeichnen sich dabei häufig durch ein vermehrtes Auftreten geladener Aminosäuren an der Proteinoberfläche aus (Jaenicke und Böhm, 1998). Für verschiedene Proteine konnte gezeigt werden, daß die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche für die Stabilität von großer Bedeutung ist. Dies belegen Experimente mit Ubiquitin (Loladze *et al.*, 1999; Spector *et al.*, 2000) sowie die Analyse stark stabilisierter Varianten des Kälteschockproteins CspB aus *Bacillus subtilis* (Martin *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002; Wunderlich *et al.*, 2005). Die im G3P selektierten stabilisierenden Mutationen sind ebenfalls an der Proteinoberfläche lokalisiert und zumindest teilweise lösungsmittel exponiert. Ladungsveränderungen scheinen hier aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen und treten nur bei den Mutationen N39K und D209Y auf. Im G3P wird durch die stabilisierenden Mutationen keine Optimierung des Oberflächenladungsnetzwerkes erreicht, lediglich lokale Änderungen der ionischen Wechselwirkungen tragen zur Stabilisierung des Proteins bei (ionische Wechselwirkungen zwischen N39K und D28). Lokale Optimierungen hydrophober Wechselwirkungen sind hier sehr viel wichtiger, wie im Falle der Mutationen T13I, N15G, G55A und T56I in der N1-Domäne gezeigt werden konnte.

Für die stabilisierenden Mutationen in der N2-Domäne F199L und Q129H können ähnliche Ursachen des stabilisierenden Effekts angenommen werden. Position 129 befindet sich in einer sehr hydrophoben Umgebung von drei Tyrosinresten, so daß die Mutation zum Histidin in der hydrophoben Tasche deutlich günstiger als das Glutamin sein müßte. Die Mutation L198P ist eine der beiden Mutationen, die das G3P des Phagen M13 vom G3P des fd-Phagen unterscheiden. An dieser Position konnten im Verlauf der verschiedenen Selektionen mehrfach Mutationen identifiziert werden (L198V, L198I, L198P), wobei die Mutation zum Prolin den größten Einfluß auf die Proteinstabilität hat. Die Mutation des Leucin zu einer C^β-verzweigten Aminosäure bzw. zum Prolin führt zu einer Veränderung der Rückgratkonformation des Loops zwischen den Aminosäuren S192 und F199 (Holliger *et al.*, 1999). Das häufige Auftreten von Mutationen an dieser Position läßt auf eine besondere Bedeutung der Rückgratkonformation an dieser Stelle schließen. Die Konformation des Loops könnte für die Pilusbindung der G3P-N2-Domäne von Bedeutung sein. Deng und Perham konnten durch ELISA-Tests mit isolierten Pili in diesem Bereich die Pilusbindungsstelle der N2-Domäne identifizieren (Deng und Perham, 2002). Der Disulfidbrücke C188-C201 wurde in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung für die Stabilisierung des Loops zugesprochen. Durch die Substitution dieser Disulfidbrücke könnte daher die Mutation zum Prolin für die benötigte „Versteifung“ des Loops bzw. die Konformationsänderung notwendig sein. Eine

solche Bedeutung der Disulfidbrücke für den Infektionsprozeß würde die Selektion zusätzlicher Mutationen an Position 198 bei der Randomisierung der Disulfidbrücke C188-C201 erklären und zeigt erneut den engen Struktur-Funktions-Zusammenhang.

4.2.4 Second-site-Mutationen sind auch im disulfidverbrückten G3P* extrem stabilisierend

Das disulfidverbrückte G3P* mit allen 14 Mutationen war enorm stabilisiert, und es ließ sich mittels thermischer Entfaltung bis 100 °C nicht vollständig entfalten. Die N1-Domäne entfaltete selbst in 6 M GdmCl erst bei 68,7 °C und war damit stabiler als die N1-Domäne von 3SS-G3P* in Abwesenheit von GdmCl. Die N1-Domäne wurde also durch die *second-site*-Mutationen um etwa 6 M GdmCl stabilisiert (3.3). Entsprechend konnte 3SS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen durch GdmCl nicht mehr vollständig entfaltet werden, und es war das extrem starke Denaturierungsmittel GdmSCN notwendig, um dieses Protein bei 35 °C vollständig zu denaturieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß trotz der Nähe der stabilisierenden Mutationen R29W und N138G zur Disulfidbrücke C46-C53 durch das Wiedereinführen der Disulfidbrücke der stabilisierende Effekt nicht beeinflußt wird, der durch die Zerstörung der ungünstigen verborgenen Salzbrücke und Wechselwirkungen mit dem benachbarten Y102 zustande kommt. Da die Cysteine an diesen Positionen ähnlich viel Platz benötigen wie die Substituenten, können sterische Behinderungen der Aminosäuren ausgeschlossen werden. Für die C7-C36 war ein stark stabilisierender Effekt zu erwarten, da diese Disulfidbrücke die N-terminale Helix mit dem globulären Teil von N1 verknüpft. Der Effekt der Disulfidbrücke C188-C201 in Kombination mit den stabilisierenden Mutationen L198P und F199L in N2 auf den für die Pilusbindung bedeutenden Loop konnte nicht untersucht werden.

Von Interesse wäre die Funktionalität des entsprechenden G3P im Phagen. Da jedoch bereits für die stabilisierten 0SS-G3P*-Varianten und 3SS-G3P* mit der Mutation R29W gezeigt werden konnte, daß die Infektiosität der Phagen mit der Stärke der Domäneninteraktionen korreliert und daher extrem verringert ist (im Falle von 3SS-G3P* R29W nur noch 0,1 % des Wildtyp-Proteins), ist von einem Verlust der Infektiosität dieser Phagen auszugehen. Dies könnte auch der Grund dafür sein, daß die sehr stark stabilisierende Mutation R29W in früheren *Proside*-Selektionen zur Stabilisierung von 3SS-G3P nicht identifiziert wurde.

4.3 Untersuchung der C-terminalen Domäne des G3P

Der Infektionsprozeß von *E. coli* durch filamentöse Phagen wird nicht allein durch das N1N2-Fragment des G3P bestimmt, auch die C-terminale Domäne ist daran beteiligt (Bennett und Rakonjac, 2006). Um den Einfluß der CT-Domäne auf Stabilität und Faltung des G3P N1N2-Fragments zu untersuchen, wurden die CT-Domäne isoliert, in Fusion mit N2 oder mit N1 und N2 charakterisiert. Neben spektroskopischen Untersuchungen gaben hier vor allem limitierte Proteolyseexperimente Aufschluß über deren Faltungszustand. Sie zeigen, daß die isolierte CT-Domäne allein nicht strukturiert vorliegt. Allerdings bestätigte die CD-

spektroskopische Analyse, daß die hydrophobe C-terminale Helix dieser Domäne strukturiert vorliegt. Das N2-CT-Konstrukt zeigte ein ähnliches Ergebnis in Proteolyse und Spektroskopie. Auch in Gegenwart der N2-Domäne liegt CT im wesentlichen ungefaltet vor. Im vollständigen Protein mit allen drei Domänen liegt die CT-Domäne hingegen teilgefaltet vor und ihre Proteaseresistenz ist deutlich erhöht. Die spektroskopische Charakterisierung des Proteins zeigt im Vergleich zum N1N2-Fragment Unterschiede bei der thermischen Entfaltung, wobei der Beitrag der CT-Domäne mangels geeigneter Sonden nicht festgestellt werden kann. Hier kann auch die Betrachtung mittels verschiedener Sonden nur Anhaltspunkte liefern. Die genaue Charakterisierung anhand spezifischer Sonden wäre hier der nächste Schritt zur Analyse des Dreidomänenproteins. Die untersuchten Konstrukte weisen darauf hin, daß CT offenbar nur in Gegenwart des N1N2-Fragments strukturiert vorliegt und die Faltung der CT-Domäne vom Kontakt mit N1 abhängig ist. Daran wird die Bedeutung von Interdomänenwechselwirkungen deutlich, die eventuell auch für die Funktion der CT-Domäne eine wichtige Rolle spielen. Es ist auch zu erwarten, daß der Transmembranbereich (Aminosäuren G379-L401) (Weiss *et al.*, 2003) in seiner Faltung von einer hydrophoben Umgebung abhängt, wie in der Membran oder der Phagenhülle. Nicht geklärt ist die Frage, ob die CT-Domäne aufgrund ihrer Funktion als eine Art flexibler *Linker* für das N1N2-Fragment nur wenig strukturiert vorliegt und im Phagenkonstrukt durch das G6P und das G8P vor Proteolyse geschützt wird. Erschwert wird die Untersuchung der CT-Domäne dadurch, daß die Struktur dieser Domäne nicht bekannt ist.

Die CT-Domäne wird in zwei funktionale Domänen eingeteilt, wobei die C1-Domäne für die Stabilisierung des assemblierten Phagen verantwortlich ist und die C2-Domäne für den Einbau in die Phagenhülle und das Verlassen der Wirtszellmembran benötigt wird. Die Disulfidbrücke C354-C371 ist in C2 lokalisiert und damit wahrscheinlich schwer zugänglich. Dies würde der Selektion zur Substitution der Disulfidbrücke in der CT-Domäne entsprechen, die zu keinem Ergebnis geführt hat (Stöckl, 2005). Ob die CT-Domäne lösungsmittel exponiert ist, wurde bislang nicht untersucht. Die Tatsache, daß das Anfügen von sieben Aminosäuren am C-Terminus des G3P keinen Einfluß auf die Phagenfreisetzung von der Wirtszelle hat, größere Insertionen hingegen schon, deutet auf eine geschützte Umgebung der CT-Domäne hin (Rakonjac *et al.*, 1999). Gemäß dem von Bennett und Rakonjac postulierten Modell für die Infektion (Bennett und Rakonjac, 2006), ist von Konformationsänderungen in der CT-Domäne bei der TolA-Bindung auszugehen, die zur Exponierung hydrophober Bereiche der CT-Domäne führen. CT muß damit flexibel sein und mit großen Konformationsänderungen das Eindringen des Phagen in die Wirtszelle ermöglichen. Diese Funktion wird möglicherweise durch die Labilität der Domäne erleichtert. Das Eindringen des Virions in die Wirtszellmembran kann *in vitro* induziert werden: durch Chloroform-Behandlung wird der Phage am G3P-Ende „geöffnet“ (Griffith *et al.*, 1981; Lopez und Webster, 1982), das G8P kann dann in die Lipiddoppelschicht integrieren (Stopar *et al.*, 1996; Williams und Deber, 1996). Dies spricht für die Bedeutung der hydrophoben Bereiche der CT-Domäne, deren Exponierung zur Initiation des Integrationsvorgangs führt.

Die CT-Domäne scheint für die Stabilität des isolierten G3P nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die tatsächliche Stabilität dieser Domäne läßt sich wahrscheinlich nur in Gegenwart des G8P oder in Membranen untersuchen. Allgemeine Schlüsse für die Stabilität eines Dreidomänenproteins können aus dem G3P N1N2CT-Konstrukt daher kaum erwartet werden. Die Ergebnisse erklären damit auch die gute Übereinstimmung der konformationellen Stabilität der G3P N1N2-Fragmente mit der Proteaseresistenz der zugehörigen Phagen.

Die CT-Domäne ist offenbar in der fd-Hülle verborgen und damit nicht proteaseempfindlich. Die Disulfidbrücke in der CT-Domäne hat daher für das Problem der inkorrekten Disulfidverbrückung mit Gastproteinen keine Bedeutung. Dies konnte durch Infektionstests von Phagen mit OSS-G3P* und intakter bzw. substituierter Disulfidbrücke C354-C371 bestätigt werden. Hier wird die Komplexität der Interproteinwechselwirkungen in komplexen Proteinsystemen deutlich.

In weiteren Untersuchungen der CT-Domäne könnte die Charakterisierung in Gegenwart von Liposomen, G6P oder G8P Aufschluß über den Faltungszustand der CT-Domäne geben. Versuche zur „Infizierbarkeit“ von *E. coli* durch dieses G3P-Konstrukt wären für die weitere Aufklärung des Infektionsmechanismus genauso von Interesse wie Mutationsanalysen der an der Infektion beteiligten Aminosäuren in der CT-Domäne.

4.4 Thermodynamische Charakterisierung der stabilisierten TEM-1 β -Lactamase

β -Lactamase ist, ebenso wie das G3P, ein Zweidomänenprotein, wobei das aktive Zentrum an der Domänengrenzfläche lokalisiert ist. In diesem Fall ist jedoch die Entfaltung der beiden Domänen nicht getrennt beobachtbar. Der thermische Entfaltungsübergang ist kooperativ und repräsentiert die Entfaltung beider Domänen. Denaturierungsmittel-induzierte Entfaltung hingegen zeigt zwei getrennte Reaktionen. Diese sind jedoch nicht den beiden Domänen zuzuordnen (Vanhove *et al.*, 1995a), sondern deuten auf ein Intermediat hin, das noch Sekundärstruktur besitzt, jedoch die Tertiärstruktur verloren hat und damit eine Art *molten globule* darstellt.

Die stabilisierenden Mutationen wurden zum Teil in Abwesenheit der C77-C123 Disulfidbrücke selektiert, aber ihr Einfluß auf Stabilität und Aktivität wurde im disulfidhaltigen Protein charakterisiert. Der Beitrag einzelner Aminosäuren kann hier daher etwas anders sein als bei der Selektion. Die meisten Mutationen waren nur schwach stabilisierend und erhöhten den Übergangsmittelpunkt meist nur um 1-1,5 °C relativ zum Wildtyp-Protein. Bei der thermischen Selektion hatten die Mutationen M182T ($\Delta T_m = 5,7$ °C) und A224V ($\Delta T_m = 3,1$ °C) den größten Effekt. Beide Mutationen sind bereits bekannt. M182T tritt als globale Suppressor-Mutation in vielen natürlichen β -Lactamasen auf, A224V konnte bereits von Hecky und Müller in einer *in vivo*-Selektion als stabilisierende Mutation identifiziert werden (Hecky und Müller, 2005). Die GdmCl-Selektion ergab zusätzlich die Mutation R275L, die das Protein um 5,0 °C stabilisierte. Die Kombination der

stabilisierenden Mutationen in einer Variante mit neun Mutationen führte zu einer Erhöhung des T_m -Wertes um 18,4 °C auf 69,2 °C. Die Analyse von Einzelvarianten zeigte, daß die Mutationen praktisch additiv sind. Genaueren Aufschluß über die Wechselwirkungen der Mutationen würden Serien von Mutationszyklen geben, die jedoch nicht mit vertretbarem Aufwand durchgeführt werden können.

Bei insgesamt vier Mutationen wurde eine geladene Aminosäure gegen einen ungeladenen Rest ausgetauscht. Dies läßt eine Verbesserung der elektrostatischen Wechselwirkungen an der Proteinoberfläche vermuten. Die Abhängigkeit der Stabilität eines Proteins von der Salzkonzentration gibt Aufschluß über diese elektrostatischen Wechselwirkungen. Ionen schirmen die Ladungen an der Oberfläche ab und schwächen die Interaktionen der geladenen Aminosäuren. Für die β -La-Varianten mit mutierten geladenen Aminosäuren konnte jedoch keine signifikante Änderung der Salzabhängigkeit der Stabilität festgestellt werden. Allerdings ist es fraglich, ob der Effekt des Austausches einer Aminosäure ausreicht, um die salzabhängige Stabilität und damit das Netzwerk elektrostatischer Wechselwirkungen an der Oberfläche stark zu verändern. Für die Mutation M182T im Zusammenhang mit P62S kann die Verbesserung des Wasserstoffbrückennetzwerkes als Ursache der Stabilisierung angenommen werden (Huang und Palzkill, 1997). Einige Mutationen sind an der Domänengrenzfläche lokalisiert und könnten deshalb zur Verbesserung der Domäneninteraktionen beitragen, jedoch sind ohne die Kristallstruktur der stabilisierten Variante nur schwer Aussagen über die strukturelle Basis der beobachteten Stabilisierungen möglich. Alle Betrachtungen hier beschränken sich auf die Analyse der Mutationen im Hintergrund der Kristallstruktur des Wildtyp-Proteins. Generell führten die selektierten Mutationen vor allem zu einer Stabilisierung des nativen Proteins relativ zum Intermediat und damit zu einer Erhöhung der Kooperativität.

Durch den Vergleich homologer Proteine aus mesophilen und thermophilen Organismen konnten einige Prinzipien der Stabilisierung immer wieder identifiziert werden. Dazu gehören eine Stabilisierung von α -Helices, ein erhöhter Anteil an Prolinen und β -verzweigten Aminosäuren, welche die Entropie des entfalteten Zustands verringern, eine verringerte Anzahl ungeladener polarer Aminosäuren und eine erhöhte Anzahl elektrostatischer Wechselwirkungen (Sternier und Liebl, 2001). Diese Prinzipien treffen auch im Falle der β -Lactamase zu. Elektrostatische Wechselwirkungen sind im Zusammenhang mit der Temperatur zu sehen, da sie von der Temperaturabhängigkeit der physikalischen Eigenschaften von Wasser und den Protein-Wasser-Interaktionen beeinflusst werden (Pace, 2000). Elektrostatische Protein-Solvens-Interaktionen werden mit zunehmender Temperatur ungünstiger, wohingegen elektrostatische Intraprotein-Wechselwirkungen begünstigt sind (Elcock und McCammon, 1997; Elcock, 1998). Die Selektion der Mutation R275L bzw. der anderen Substitutionen von geladenen Aminosäuren könnte diese ungünstigen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel einschränken.

Bei der Stabilisierung eines Enzyms ist neben der Stabilität immer auch der Erhalt der Aktivität von Interesse. Bei natürlichen Enzymen ist häufig eine inverse Korrelation zwischen

Thermostabilität und Aktivität zu beobachten, die in der Bedeutung der Proteinflexibilität begründet liegt. Konformationelle Stabilität und eine hohe Aktivität bei niedrigen Temperaturen schließen sich jedoch nicht aus, sondern sind vielmehr durch die natürliche Evolution der Proteine bedingt (Giver *et al.*, 1998; Zhao und Arnold, 1999; Gershenson und Arnold, 2000; Song und Rhee, 2000, Lehmann *et al.*, 2000). Da hohe Thermostabilität und Aktivität bei niedriger Temperatur in der Natur nicht in Kombination erforderlich sind, fehlt der Selektionsdruck für solche Proteine (Miyazaki *et al.*, 2000). So konnte mittels gerichteter Evolution die schwache Aktivität der Indolglycerinphosphat-Synthase des hyperthermophilen *Sulfolobus solfataricus* durch eine Kombination von Zufallsmutagenese und *in vivo*-Selektion erhöht werden (Merz *et al.*, 2000). Für die β -Lactamase zeigt sich ein ähnliches Resultat, die Aktivitäten der stabilisierten Varianten waren eher erhöht. Alle selektierten Varianten zeigen auch β -La-Aktivität (Voraussetzung bei der Selektion), das Temperaturoptimum der Aktivität ist bei den stabileren Varianten erhöht. Dies wird vor allem beim Vergleich der Kombinationsvariante mit allen stabilisierenden Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich (3.6.7).

Insgesamt konnten die Selektion und die Charakterisierung der disulfidfreien G3P*-Varianten und der β -Lactamase-Varianten zeigen, daß Selektionen immer am schwächsten Punkt ansetzen. Bei den bisher untersuchten kleinen Proteinen wurde für das Kälteschockprotein CspB durch die Eliminierung ungünstiger Ladungswechselwirkungen eine Stabilisierung erzielt (Martin *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002; Wunderlich *et al.*, 2005). Bei der β -Domäne des Streptococcen-Proteins G führte die Eliminierung von Packungsdefekten zur Stabilisierung (Wunderlich *et al.*, 2005; Wunderlich und Schmid, 2006). Die Analyse der größeren Proteine in dieser Arbeit zeigte für das G3P filamentöser Phagen eine Optimierung der Domäneninteraktionen als Stabilisierungsprinzip. Bei der β -Lactamase führte eine Stärkung des nativen Zustands relativ zum *molten globule*-Zustand zu einer Erhöhung der Kooperativität und damit zur Stabilisierung des Proteins.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, große Proteine bzw. Enzyme durch *Proside* zu stabilisieren und die selektierten Varianten biophysikalisch zu charakterisieren. *Proside* ist eine auf dem *phage display* basierende *in vitro*-Evolution-Methode zur Selektion stabilisierter Proteinvarianten, wobei eine erhöhte Proteaseresistenz stabilisierter Proteinvarianten mit der Infektiosität filamentöser Phagen verknüpft wird. Dieses System hatte sich bereits bei der Selektion stabilisierter Varianten kleinerer Proteine als sehr effektiv erwiesen. Die evolutive Stabilisierung großer Proteine bzw. Enzyme ist besonders wichtig, weil deren Optimierung mittels rationalen Designs aufgrund der fehlenden Kenntnis der Struktur-Stabilitäts-Zusammenhänge fast unmöglich ist. Zum einen sind stabilisierte Enzyme in der industriellen Anwendung von großem Interesse, zum anderen ermöglicht die Analyse der stabilisierenden Effekte, vor allem auch im strukturellen Zusammenhang, Einblicke in die Prinzipien der Stabilität von Mehr-Domänen-Proteinen.

Im *Proside*-System wird das zu stabilisierende Gastprotein zwischen die N2- und die CT-Domäne des G3P filamentöser Phagen eingebaut. *Proside* ist ein sehr effektives Selektionssystem, die Stabilisierung größerer Gastproteine ist jedoch schwierig. Cysteinhaltige Gastproteine können mit den Disulfidbrücken des G3P inkorrekte Disulfidbrücken bilden, wodurch die Infektiosität der Phagen verlorengeht. Außerdem nimmt die Infektiosität der Phagen mit der zunehmenden Größe des Gastproteins ab. Dieses Phänomen tritt besonders in Kombination mit dem Problem des Verlusts von Gastproteinen durch homologe Rekombination in Erscheinung. Phagen, die durch Rekombination das Gastprotein verlieren, sind in der *in vitro*-Proteolyse stark begünstigt und zusätzlich auch infektiöser als Phagen mit dem vollständigen Gastproteininsert. Die Folge ist eine Anreicherung der rekombinanten Phagen in der Bibliothek.

Ziel der Arbeit war deshalb zunächst, das Selektionssystem so zu modifizieren, daß es auf größere Proteine angewendet werden kann. Um das Problem der inkorrekten Disulfidverbrückung zu eliminieren, wurden die drei Disulfidbrücken im N1N2-Fragment des G3P durch *Proside*-Selektion substituiert und damit ein infektiöser Phage mit disulfidfreiem G3P konstruiert. Dies wurde in mehreren Schritten erreicht. Dazu wurden zunächst die drei Disulfidbrücken unabhängig voneinander randomisiert, und nach *Proside*-Selektion konnten für die Positionen C188 / C201 in der N2-Domäne die optimale Kombination Val / Ala und für C46 / C53 in der N1-Domäne die optimale Kombination Ile / Val identifiziert werden. Dies führte zu infektiösen Phagen mit einem G3P mit nur noch einer Disulfidbrücke an Position 7 / 36 in der N1-Domäne (1SS-G3P*). Dieses G3P wurde einer Zufallsmutagenese mittels fehlerbehafteter PCR mit anschließender *Proside*-Selektion unterworfen, um das Protein vor dem Austausch der letzten Disulfidbrücke durch *second-site* Mutationen zu stabilisieren. Es konnten neun verschiedene Mutationen selektiert werden. Die besonders stark stabilisierenden Mutationen R29W und N39K wurden mit der 1SS-G3P*-Variante

kombiniert, die letzte Disulfidbrücke C7-C36 mittels ortsgerichteter Mutagenese durch ein Ser / Ile-Paar substituiert und die so erhaltenen Phagen mit disulfidfreiem G3P* erneut einer Zufallsmutagenese gefolgt von *Proside*-Selektion unterworfen. In dieser letzten Selektion konnten drei neue Mutationen in der durch den Disulfidverlust besonders destabilisierten N1-Domäne identifiziert werden. Phagen mit dem 0SS-G3P* N15G / R29W / N39K / G55A / F199L besitzen 10 % der Infektiosität des 3SS-G3P*-Phagen, und das selektierte 0SS-G3P* ist stabiler als das disulfidverbrückte Wildtyp-Protein. Kombination aller Mutationen in einer Variante ergibt ein im Vergleich zum Wildtyp-Protein um 19,0 °C stabilisiertes disulfidfreies G3P*. Die 14 *second-site* Mutationen konnten so den Verlust von drei Disulfidbrücken überkompensieren.

Die Einzelbeiträge zur Stabilisierung wurden mit Hilfe vieler Einzel- und Mehrfachmutanten charakterisiert und auf der Basis der Kristallstruktur des stabilisierten 0SS-G3P* analysiert. Dies ergab, daß verbesserte Domäneninteraktionen einen enormen Beitrag zur Stabilität leisten. In diesem Zusammenhang sind vor allem die Mutation R29W (N1) und N138G (N2) und der an der Domänengrenzfläche lokalisierte Disulfidbrückenersatz C46I / C53V von Bedeutung. Innerhalb der beiden Domänen sind sowohl elektrostatische Wechselwirkungen (N39K) als auch verbesserte hydrophobe Interaktionen (Q129H; N15G) für die Stabilisierung verantwortlich.

Das Protein mit den drei Disulfidbrücken konnte durch die Einführung der stabilisierenden Mutationen um etwa sechs GdmCl-Einheiten im Vergleich zum 3SS-G3P* ohne *second-site*-Mutationen stabilisiert werden. Dies zeigt die Kontextunabhängigkeit der *second-site*-Mutationen in Bezug auf die Disulfidbrücken.

Das G3P besitzt neben den Domänen N1 und N2 eine C-terminale Domäne CT, die auch für den Infektionsprozeß von Bedeutung ist. Diese Domäne wurde allein oder in Fusion mit N2 bzw. N1 und N2 exprimiert. Die isolierte CT-Domäne ist bis auf eine hydrophobe Helix entfaltet. Lediglich in Gegenwart von N1 und N2 besitzt sie eine marginale konformationelle Stabilität. Die Funktion der CT-Domäne bei Infektion und Phagenaustritt aus der Wirtszelle beruht auf der Exponierung hydrophober Oberflächen für die Interaktion mit der Wirtszellmembran, so daß eine flexible bzw. nur marginal stabile Domäne hierfür sehr geeignet scheint.

Als Modellprotein für große Enzyme wurde die TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli* durch Zufallsmutagenese und *Proside*-Selektion stabilisiert. Ebenso wie im Fall des G3P wurde eine große Stabilisierung des Enzyms um 18,4 °C ($\Delta\Delta G_D = 27,2$ kJ/mol) durch eine stufenweise Selektion und anschließende Kombination der stabilisierenden Mutationen erreicht. Dazu wurde zunächst das Wildtyp-Protein einer Zufallsmutagenese unterworfen, in der anschließenden Selektion konnte vor allem der als globale Suppressor-Mutation bekannte Austausch M182T identifiziert werden. Die Selektion in Abwesenheit der C77-C123-Disulfidbrücke führte zu einer Vielzahl zusätzlicher stabilisierender Mutationen, und durch Selektion in Gegenwart von GdmCl konnte eine weitere stark stabilisierende Mutation (R275L) identifiziert werden. Die Prinzipien der Stabilisierung beruhen bei β -Lactamase auf

einer Verbesserung der Domäneninteraktionen (M182T, P62S, I208M) und verbesserten hydrophoben Interaktionen (A224V, V80I). Die stabilisierte Kombinationsvariante ist bei niedriger Temperatur etwa doppelt so aktiv wie das Wildtyp-Protein, und das Optimum der Aktivität ist zu höheren Temperaturen verschoben.

Die Selektion stabilisierter Varianten war nur bei gleichzeitiger Selektion auf Ampicillin-Resistenz der infizierten Zellen möglich. Da der Phagentiter niedrig war, dominierten in Abwesenheit von Ampicillin rekombinante Phagen ohne Gastprotein die *in vitro*- und *in vivo*-Selektion. Um dieses Problem bei großen Gastproteinen ausschließen zu können, wurde ein alternatives Selektionssystem etabliert, wobei das zu stabilisierende Gastprotein aus der ursprünglichen Position zwischen der N2- und der CT-Domäne an den Beginn des G3P verschoben und mit einem N-terminalen Cystein als Selektions-*Tag* versehen wird. Die Phagenbibliothek wird auch in diesem Fall einer Proteolyse unterworfen, die Selektion beruht jedoch nicht auf einer Kombination von Proteaseresistenz und Infektiosität des Phagen, sondern auf der Kombination Proteaseresistenz und Bindung an eine Affinitätsmatrix. Die Infektiosität der Phagen wird durch ein N-terminal angefügtes Gastprotein nicht beeinflusst, und in ersten Selektionsversuchen mit β -Lactamase konnten stabilisierte Varianten angereichert werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit das *Proside*-Selektionssystem in seiner Anwendbarkeit durch die Generierung eines stabilen, disulfidfreien G3P erweitert werden. Eine kombinierte Selektion auf Stabilität und Aktivität lieferte Erfolge bei der Stabilisierung großer Proteine.

Die Entwicklung einer extrem stabilen disulfidfreien G3P-Variante sowie die Selektion einer stark stabilisierten und gleichzeitig aktiven β -Lactamase-Variante sind für das Verständnis der Prinzipien von Proteininstabilität im Zusammenhang mit Funktionalität bzw. Aktivität von besonderem Interesse. Ein alternatives Selektionssystem für die Stabilisierung von Proteinen wurde etabliert, bedarf jedoch noch der Optimierung.

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits publiziert:

Kather, I., Bippes, C. A. und Schmid, F. X. (2005). A stable disulfide-free gene-3-protein of phage fd generated by *in vitro* evolution. *J. Mol. Biol.* **354**, 666-678.

Zwei weitere Manuskripte sind in Bearbeitung:

1. Stabilitäts-Struktur-Zusammenhang im disulfidfreien G3P*
2. Evolutive Stabilisierung von TEM-1 β -Lactamase aus *E. coli*

6 Summary

The aim of the thesis was the application of *Proside* to stabilize large proteins or even enzymes and to characterize the selected variants with biophysical methods. *Proside* is an *in vitro*-evolution method for the selection of stabilized protein variants based on phage display. It combines an increased protease resistance of stabilized protein variants with the infectivity of a filamentous phage. In the past, this selection system was successfully applied to several small proteins. However, the stabilization of larger proteins or enzymes would be of great interest as this cannot be achieved by rational design because of the lack of knowledge of the structure-stability-relationship. On the one hand, stabilized enzymes are of major industrial importance, on the other hand the analysis of the stabilizing effects gives insight into the principles of protein stability in multi-domain proteins.

In *Proside*, a library of the protein to be stabilized is inserted between the N2 and the CT domain of the gene-3-protein (G3P) of filamentous phage. *Proside* is difficult to apply to larger proteins. Cysteine-bearing guest proteins often form incorrect disulfide bonds with the disulfides of the G3P, resulting in the loss of infectivity of the corresponding phage. Furthermore, the infectivity of the phage decreases when the size of the guest protein increases. This phenomenon is linked with the loss of the guest protein by homologous recombination. Recombinant phage without a guest protein have an advantage in both the *in vitro* proteolysis and the subsequent infection step. Thus, the recombinant phage become enriched in the library.

Therefore, the selection system must be tailored to accommodate to large proteins. To avoid the problem of incorrect disulfide bonds between G3P and the guest protein the three disulfides in the G3P N1N2 fragment were substituted by *Proside* selection to generate an infectious phage with a stable disulfide-free G3P. This was accomplished by a stepwise approach. First, the three disulfide bonds were randomized individually in independent libraries, and the *Proside* selection yielded the optimal amino acid combination Val / Ala for the positions C188 / C201 in the N2 domain and the optimal combination Ile / Val for C46 / C53 in the N1 domain. These selections gave an infectious phage with only the disulfide C7 / C36 in the N1 domain remaining. The resulting G3P (1SS-G3P*) was subjected to random mutagenesis through error-prone PCR followed by *Proside* selection. Nine stabilizing second-site mutations were identified, in particular R29W and N39K. These two strongly stabilizing mutations were combined with the 1SS-G3P* variant, the last disulfide C7 / C36 was substituted by an Ser / Ile pair by directed mutagenesis, and these disulfide-free phages were then subjected to another random mutagenesis followed by *Proside* selection. In this last selection three additional mutations were identified in the N1 domain. Phage hosting the 0SS-G3P* with the stabilizing mutations (N15G / R29W / N39K / G55A / F199L) retain 10 % of the infectivity of 3SS-G3P*, and the selected 0SS-G3P* is more stable than the original disulfide-bonded wild-type protein. Manual combination of all the stabilizing

mutations leads to a 0SS-G3P* variant which is 19.0 °C more stable than the wild-type protein. The 14 second-site mutations thus overcompensate by far the loss of the three disulfides.

The stabilizing effects of the single mutations were characterized by the analysis of a large number of single and combinatorial mutants and by the structure-based analyses of the 0SS-G3P*. These considerations reveal an enormous contribution of optimized domain interactions to stability. Regarding this, the mutations R29W (N1), N138G (N2), and the disulfide substitution I46 / V53 at the domain interface are of major importance. Intradomain stabilization is achieved by additional electrostatic interactions (N39K) as well as improved hydrophobic interactions (Q129H, N15G).

The introduction of all the stabilizing mutations into G3P with the three disulfides stabilized this protein by about six GdmCl units relative to 3SS-G3P* without these mutations. This demonstrates that these mutations are strongly stabilizing in the presence of the disulfides as well.

In addition to domains N1 and N2, G3P consists of the C-terminal domain CT which is also important for the infection process. This domain was expressed in isolation or in combination with either N2 or N1 and N2. The isolated CT domain is unfolded, except for a hydrophobic helix. Only in the presence of both N1 and N2, CT adopted a marginally stable folded conformation. The function of the CT domain in the infection mechanism and for phage release from the host cell is based on the exposure of hydrophobic surface. Therefore, a flexible or marginally stable domain might be well suited to fulfill these requirements.

As a model protein for large enzymes, the TEM-1 β -lactamase of *E. coli* was stabilized by random mutagenesis and *Proside* selection. As well as for the G3P, a strong stabilization of the enzyme by 18.4 °C ($\Delta\Delta G_D = 27,2$ kJ/mol) was achieved by a stepwise selection strategy followed by the combination of the stabilizing mutations. First, the wild-type protein was mutagenized by random mutagenesis, and in the following selection, the already known global suppressor mutation M182T was identified in several clones. *Proside* selection after random mutagenesis of the disulfide-free β -lactamase led to further identification of a number of stabilizing mutations, and the selection in the presence of the denaturant GdmCl revealed another strongly stabilizing mutation (R275L). The principles of the stabilization in the β -lactamase are based on improved domain interactions (M182T, P62S, I208M) and improved hydrophobic interactions (A224V, V80I). The β -lactamase with all stabilizing mutations is twice as active as the wild-type protein at low temperatures, and the optimum of the activity is shifted to higher temperature.

The selection of stabilized β -La-variants could be achieved because only the phage with functional β -La inserts would propagate in the presence of ampicillin. The phage titer was low, and in the absence of ampicillin recombinant phage without guest protein dominated both the *in-vitro* and the *in-vivo* selection. An alternative selection system was therefore developed for large proteins. The protein to be stabilized is shifted from the position between the domains N2 and CT to the N-terminus of the G3P and combined with an N-terminal

cysteine as a selection-tag. The corresponding phage library is treated with a protease, as in the case of *Proside*. However, in this system the selection is not based on the combination of protease resistance and infectivity of the corresponding phage but on the combination of protease resistance and binding to thiol-sepharose. The infectivity of the phage is not influenced by an N-terminally fused guest protein, and first experiments with β -lactamase led to the selection of stabilized variants.

In summary, the *Proside* selection system could be improved in its application by generating a stable disulfide-free G3P, and the stabilization of large proteins was successfully achieved by using the combined selection for stabilized and active protein variants.

The generation of an extremely stable disulfide-free G3P-variant as well as the selection of a stabilized and active β -La-variant reveals the principles of protein stability in the context of functionality and activity. An alternative selection system for the stabilization of large proteins was established but needs further optimization.

7 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
α	Nativähnlichkeit des Übergangszustands in Bezug auf die Zugänglichkeit für Lösungsmittel
β -La	β -Lactamase
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>Circular dichroism</i>
cfu	<i>colony forming units</i> (Kolonie-bildende Einheiten)
ΔC_p	Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung eines Proteins bei konstantem Druck
C_p	Wärmekapazität der Entfaltungsreaktion
CIP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> (alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
Cm	Chloramphenicol
CT	C-terminale Domäne des Gen-3-Proteins
D	Denaturierungsmittel
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleotide
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ssDNA	Einzelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dYT	doppeltes <i>yeast-tryptone</i> -Medium
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
ΔG_D	freie Enthalpie der Entfaltungsreaktion
GdmCl	Guanidiniumchlorid
$[\text{GdmCl}]_{1/2}$	Mittelpunkt des GdmCl-induzierten Entfaltungsübergangs
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
G3P	Gen-3-Protein filamentöser Phagen
G3P*	Gen-3-Protein mit den stabilisierenden Mutationen T13I / T101I / Q129H / D209
2SS-G3P*	G3P* mit C188V / C201A und intakten Disulfidbrücken in N1 (C46-C53, C7-C36)
1SS-G3P*	G3P* mit den Disulfidbrückensubstitutionen C188V / C201A und C46I / C53V und intakter Disulfidbrücke C7-C36

0SS-G3P*	disulfidfreies G3P* mit den Disulfidbrückensubstitutionen C188V / C201A, C46I / C53V und C7S / C36I
ΔH_D	Enthalpie der Entfaltungsreaktion
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k_{NU}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Entfaltungsreaktion
k_{UN}	mikroskopische Geschwindigkeitskonstante einer Rückfaltungsreaktion
Km	Kanamycin
λ	apparente Ratenkonstante ($= k_{NU} + k_{UN}$)
λ_{EX}	Anregungswellenlänge
λ_{EM}	Emissionswellenlänge
m	Kooperativitätsparameter der Entfaltungsreaktion ($\delta\Delta G / \delta\Delta[D]$)
m_{NU}	kinetischer m -Wert der Entfaltungsreaktion ($\delta\ln k_{NU} / \delta\Delta[D]$)
m_{UN}	kinetischer m -Wert der Rückfaltungsreaktion ($\delta\ln k_{UN} / \delta\Delta[D]$)
n	Brechungsindex
N	nativer Zustand des Proteins
N1	N1-Domäne des Gen-3-Proteins
N2	N2-Domäne des Gen-3-Proteins
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS-Puffer	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNK	Polynukleotid-Kinase
RT	Raumtemperatur
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
τ	Zeitkonstante einer Reaktion
T_m	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsübergangs
$[\theta]_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ($\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$)
U	entfalteter Zustand eines Proteins
ÜNK	Übernachtskultur
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Die Aminosäuren wurden mit dem Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt, Austausch einer Aminosäure A gegen Aminosäure B an Position X der Polypeptidkette wurden mit AXB bezeichnet.

8 Literatur

- Adey, N. B., Mataragnon, A. H., Rider, J. E., Carter, J. M. und Kay, B. K. (1995). Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene* **156**(1), 27-31.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**(1036), 321-331.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**(96): 223-230.
- Armstrong, J., Perham, R. N. und Walker, J. E. (1981). Domain structure of bacteriophage fd adsorption protein. *FEBS Lett.* **135**, 167-172.
- Arnold, F. A. und Volkov, A. A. (1999). Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**(1), 54-59.
- Atwell, S. und Wells, J. A. (1999). Selection for improved subtiligases by phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(17), 9497-9502.
- Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R., Scott, J. K. und Silverman, G. J. (2001) Phage Display: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.*
- Beasty, A. M., Hurlle, M.R., Manz, J. T., Stackhouse, T., Onuffer, J. J. und Matthews, C. R. (1986). Effects of the phenylalanine-22-leucine, glutamic acid-49-methionine, glycine-234-aspartic acid, and glycine-234-lysine mutations on the folding and stability of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**, 2965-2974.
- Becktel, W. J. und Schellmann, J. A. (1987). Protein stability curves. *Biopolymers* **26**(11), 1859-1877.
- Bennett, N. J. und Rakonjac, J. (2006). Unlocking of the filamentous bacteriophage virion during infection is mediated by the C domain of pIII. *J. Mol. Biol.* **356**(2), 266-273.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T. und Skerra, A. (1999). Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(5), 1898-1903.
- Betz, S. F., (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Sci.* **2**(10), 1551-1558.
- Bhattacharyya, R., Pal, D. und Chakrabarti, P. (2004). Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures. *Prot. Eng. Des. Sel.* **17**(11), 795-808.
- Bianchi, E., Folgori, A., Wallace, A., Nicotra, M., Acali, S., Phalipon, A., Barbato, G., Bazzo, R., Cortese, R., Felici, F et al. (1995). A conformational homogeneous combinatorial peptide library. *J. Mol. Biol.* **247**(2), 154-160.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G. und Plückthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat. Biotechnol.* **22**(5), 575-582.
- Bippes, C. (2004). Evolutive Stabilisierung des Gen-3-Proteins des Phagen fd. Ausgleich des Stabilitätsverlusts auf Grund fehlender Disulfidbrücken. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Boeke, J. D. und Model, P. (1982). A prokaryotic membrane anchor sequence-carboxyl terminus of bacteriophage-f1 gene-III protein retains it in the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5200-5204.
- Bonnycastle, L. L., Mehroke, J. S., Rashed, M., Gong, X. und Scott, J. K. (1996). Probing the basis of antibody reactivity with a panel of constrained peptide libraries displayed by filamentous phage. *J. Mol. Biol.* **258**(5), 747-762.
- Bradbury, A. R. und Marks, J. D. (2004). Antibodies from phage antibody libraries. *J. Immunol. Methods* **290**(1-2), 29-49.
- Brandts, J. F., Hu, C.Q. und Lin, L.-N. (1989). A simple model for proteins with interacting domains. Application to scanning calorimetry data. *Biochemistry* **28**, 8588-8596.
- Brik, A., D'Souza, L. J., Keinan, E., Grynszpan, F. und Dawson, P. E. (2002). Mutants of 4-oxalocrotonate tautomerase catalyze the decarboxylation of oxaloacetate through an imine mechanism. *Chembiochem* **3**(9), 845-851.
- Brinkmann, U., Chowdhury, P. S., Roscoe, D. M. und Pastan, I. (1995). Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. *J. Immunol. Methods* **182**, 41-50.
- Brock, T. D. (1967). Life at high temperatures. Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. *Science* **158**(804), 1012-1019.
- Brocklehurst, K., Carlsson, J., Kierstan, M. P. und Crook, E. M. (1973). Covalent chromatography. Preparation of fully active papain from dried papaya latex. *Biochem. J.* **133**(3), 573-584.
- Brunet, E., Chauvin, C., Choumet, V. und Jestin, J. L. (2002). A novel strategy for the functional cloning of enzymes using filamentous phage display: the case of nucleotidyl transferases. *Nucleic Acids Res.* **30**(9), 1-4.
- Campos, L. A., Garcia-Mira, M. M., Godoy-Ruiz, R., Sanchez-Riuz, J. M. und Sancho, J. (2004). Do proteins always benefit from a stability increase? Relevant and residual stabilisation in a three-state protein by charge optimization. *J. Mol. Biol.* **344**, 223-237.

- Castagnoli, L., Zucconi, A., Quondam, M., Rossi, M., Vaccaro, P., Panni, S., Paoluzi, S., Santonico, E., Dente, L. und Cesareni, G. (2001). Alternative bacteriophage display systems. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **4**(2), 121-133.
- Cedrone, F., Menez, A. und Quéméneur, E. (2000). Tailoring new enzyme functions by rational redesigns. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**(4), 405-410.
- Chakravarty, S., Mitra, N., Queitsch, I., Surolia, A., Varadarajan, R. und Dübel, S. (2000). Protein stabilization through phage display. *FEBS Lett.* **476**, 296-300.
- Chatellier, J., Hartley, O., Griffiths, A. D., Fersht, A. R., Winter, G. und Riechmann, L. (1999). Interdomain interactions within the gene 3 protein of filamentous phage. *FEBS Lett.* **463**, 371-4.
- Chatterjee, R. und Yuan, L. (2006). Directed evolution of metabolic pathways. *Trends Biotechnol.* **24**(1), 28-38.
- Cherry, J. R. und Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**(4), 438-443.
- Clarke, L. und Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**(1), 91-9.
- Clarke, J., Fersht, A. R. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* **32**(16): 4322-4329.
- Click, E. M. und Webster, R. E. (1997). Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein. *J. Bacteriol.* **179**, 6464-71.
- Cramer, R. und Suter, M. (1993). Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* **137**(1), 69-75.
- Creighton, T. E. (1978). Experimental studies of protein folding and unfolding. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **33**(3), 231-297.
- Crissman, J. W. und Smith, G. P. (1984). Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology* **132**, 445-455.
- Dalby, P. A., Hoess, R. H. und DeGrado, W. F. (2000). Evolution of binding affinity in a WW domain probed by phage display. *Protein Sci.* **9**(12), 2366-2376.
- Damoiseau, R., Schultz, P. G. und Johnsson, K. (2002). Towards the generation of artificial O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases: in vitro selection of antibodies with reactive cysteine residues. *Chembiochem* **3**(6), 573-575.
- Dantas, G., Kuhlman, B., Callender, D., Wong, M. und Baker, D. (2003). A large scale test of computational protein design: Folding and stability of nine completely redesigned globular proteins. *J. Mol. Biol.* **332**, 449-460.
- Datta, N. und Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* **208**(5007), 239-241.
- Davis, N. G., Boeke, J. D. und Model, P. (1985). Fine structure of a membrane anchor domain. *J. Mol. Biol.* **181**(1), 111-121.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**, 375-382.
- Demartis, S., Huber, A., Viti, F., Lozzi, L., Giovannoni, L., Neri, P., Winter, G. und Neri, D. (1999). A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **286**(2), 617-633.
- de Haard, H., Kazemier, B., van der Bent, A., Oudshoorn, P., Arends, J. W. und van Gemen, B. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* **274**(26), 18218-18230.
- Deng, S. J., MacKenzie, C. R., Sadowska, J., Michniewicz, J., Young, N. M., Bundle, D. R. und Narang, S. A. (1994). Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *J. Biol. Chem.* **269**, 9533-9538.
- Deng, L.-W., Pratap, M. und Perham, R. N. (1999). Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *Virology* **253**, 271-77.
- Deng, L.-W. und Perham, R.N. (2002). Delineating the site of interaction on the pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **319**, 603-14.
- Deperthes, D. (2002). Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity. *Biol. Chem.* **383**(7-8), 1107-1112.
- Derouiche, R., Gavioli, M., Benedetti, H., Prilipov, A., Lazdunski, C. und Lloubes, R. (1996). TolA central domain interacts with *Escherichia coli* porins. *EMBO J.* **15**, 6408-15.
- Eckert, B., Martin, A., Balbach, J. und Schmid, F. X. (2005). Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat. Struct. Biol.* **12**(7), 619-623.
- Ehrlich, S. D., Bierne, H., d'Alencon, E., Vilette, D., Petranovic, M., Noirot, P. und Michel, B. (1993). Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* **135**(1-2), 161-166.
- Elcock, A. H., Huber, G. A. und McCammon, J. A. (1997). Electrostatic channeling of substrates between enzyme active sites: comparison of simulation and experiment. *Biochemistry* **36**(51), 16049-16058.

- Elcock, A. H. (1998). The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **284**, 489-502.
- Endemann, H. und Model, P. (1995). Location of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells. *J. Mol. Biol.* **250**(4), 496-506.
- Feng, D. F., Cho, G. und Doolittle, R. F. (1997). Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(24), 13028-13033.
- Fernández, L. A. (2004). Prokaryotic expression of antibodies and affibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 364-373.
- Fernandez-Gacio, A., Uquen, M. und Fastrez, J. (2003). Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol.* **21**(9), 408-414.
- Finucane, M. D., Tuna, M., Lees, J. H. und Woelfson, D. N. (1999a). Core-directed protein design. I. An experimental method for selecting stable proteins from combinatorial libraries. *Biochemistry* **38**(36), 11604-11612.
- Finucane, M. D. und Woelfson, D. N. (1999b). Core-directed protein design. II. Rescue of a multiply mutated and destabilized variant of ubiquitin. *Biochemistry* **38**(36), 11613-11623.
- Fisher, J. F., Meriueh, S. O. und Mobashery, S. (2005). Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* **105**(2), 395-424.
- FitzGerald, K. (2000). In vitro display technologies-new tools for drug discovery. *Drug Discov. Today* **5**(6), 253-258.
- Forrer, P., Stumpp, M. T., Binz, H. K. und Plückthun, A. (2003). A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins. *FEBS Lett.* **539**(1-3), 2-6.
- Frère, J. M. (1995). Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* **16**(3), 385-395.
- Fuh, G. und Sidhu, S. S. (2000). Efficient phage display of polypeptides fused to the carboxy-terminus of the M13 gene-3 minor coat protein. *FEBS Lett.* **480**(2-3), 231-234.
- Gao, C., Mao, S., Lo, C. H., Wirsching, P., Lerner, R. A. und Janda, K. D. (1999). Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(11), 6025-6030.
- Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, J. M. und Dideberg, O. (2005). A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.* **345**(4), 785-795.
- Garel, J.-R. (1992). Folding of large proteins: multidomain and multisubunit proteins. In *Protein Folding* 1 edit. (Creighton, T. E., ed.), pp. 405-454. Freeman, New York.
- Gershenson, A. und Arnold, F. H. (2000). Enzyme stabilization by directed evolution. *Genet. Eng.* **22**, 55-76.
- Gervasoni, P. und Plückthun, A. (1997). Folding intermediates of beta-lactamase recognized by GroEL. *FEBS Lett.* **401**(2-3), 138-142.
- Ghuysen, J. M., Charlier, P., Coyette, J., Duez, C., Fonze, E., Fraipont, C., Goffin, C., Joris, B. und Nguyen-Disteche, M. (1996). Penicillin and beyond: evolution, protein fold, multimodular polypeptides, and multiprotein complexes. *Microb. Drug Resist.* **2**(2), 163-175.
- Goldenberg, D. P., Bekeart, L. S., Laheru, D. A. und Zhou, J. D. (1993). Probing the determinants of disulfide stability in native pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **32**(11), 2835-2844.
- Goto, Y. und Hamaguchi, K. (1982). Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J. Mol. Biol.* **156**(4), 911-926.
- Gray, C. W., Brown, R. S. und Marvin, D. A. (1981). Adsorption complex of filamentous fd virus. *J. Mol. Biol.* **146**(4), 621-627.
- Griffith, J., Manning, M. und Dunn, K. (1981). Filamentous bacteriophage contract into hollow spherical particles upon exposure to a chloroform-water interface. *Cell* **23**(3), 747-753.
- Gruber, C. W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J. L., Craik und D. J. (2006). Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem. Sci.* **31**(8), 455-464.
- Guan, Y., Zhang, H. und Wang, A. H. (1995). Electrostatic potential distribution of the geneV protein from Ff phage facilitates cooperative DNA binding: a model of the GVP-ssDNA complex. *Protein Sci.* **4**(2), 187-197.
- Hagihara, Y., Shiraki, K., Nakamura, T., Uegaki, K., Takagi, M., Imanaka, T. und Yumoto, N. (2002). Screening for stable mutants with amino acids pairs substituted for the disulfide bond between residues 14 and 38 of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *J. Biol. Chem.* **277**, 51043-51048.
- Hanes, J. und Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(10), 4937-42.
- Hansson, M., Ringdahl, J., Robert, A., Power, U., Goetsch, L., Nguyen, T. N., Uhlen, M., Stahl, S. und Nygren, P. A. (1999). An in vitro selected binding protein (affibody) shows conformation-dependent recognition of the respiratory syncytial virus (RSV) G protein. *Immunotechnology* **4**(3-4), 237-252.

- Hecky, J. und Müller, K. M. (2005). Structural perturbation and compensation by directed evolution at physiological temperature leads to thermostabilization of beta-lactamase. *Biochemistry* **44**(38), 12640-12654.
- Heinis, C., Huber, A., Demartis, S., Bertschinger, J., Melkko, S., Lozzi, L., Neri, P. und Neri, D. (2001). Selection of catalytically active biotin ligase and trypsin mutants by phage display. *Protein Eng.* **14**(12), 1043-1052.
- Heinz, U. und Adolph, H. W. (2004). Metallo-beta-lactamases: two binding sites for one catalytic metal ion? *Cell Mol. Life Sci.* **61**(22), 2827-2839.
- Herzberg, O. (1991). Refined crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**(4), 701-719.
- Hinck, A. P., Truckses, D. M. und Markley, J. L. (1996). Engineered disulfide bonds in staphylococcal nuclease: effects on the stability and conformation of the folded protein. *Biochemistry* **35**(32), 10328-10338.
- Holliger, P. und Riechmann, L. (1997). A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd. *Structure* **5**(2), 265-275.
- Holliger, P., Riechmann, L. und Williams, R. L. (1999). Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability. *J. Mol. Biol.* **288**, 649-57.
- Huang, W. und Palzkill, T. (1997). A natural polymorphism in beta-lactamase is a global suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(16), 8801-8806.
- Hufton, S. E., Moerkerk, P. T., Meulemans, E. V., de Bruine, A., Arends, J. W. und Hoogenboom, H. R. (1999). Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenetic ligands. *J. Immunol. Methods* **231**(1-2), 39-51.
- Jackson, S. E. und Fersht, A. R. (1991). Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 2. Influence of proline isomerization on the folding kinetics and thermodynamic characterization of the transition state of folding. *Biochemistry* **30**(43), 10436-10443.
- Jackson, S. E. (1998). How do single-domain proteins fold? *Fold. Des.* **3**(4), R81-91.
- Jacobson, A. (1972). Role of F-pili in the penetration of bacteriophage f1. *J. Virol.* **10**, 835-43.
- Jaenicke, R. (1991). Protein Stability and Molecular Adaptation to Extreme Conditions. *Eur. J. Biochem.* **202**(3), 715-728.
- Jaenicke, R. und Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 738-748.
- Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J. M. und Samama, J. P. (1993). Crystal structure of *Escherichia coli* TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins* **16**(4), 364-383.
- Jespers, L. S., Messens, J. H., De Keyser, A., Eeckhout, D., Van den Brande, I., Gansemans, Y. G., Lauwereys, M. J., Vlasuk, G. P. und Stanssens, P. E. (1995). Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology* **13**(4), 378-382.
- Johannes, T. W. und Zhao, H. (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**(3), 261-267.
- Jung, S. und Plückthun, A. (1997). Improving *in vivo* folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting. *Protein Eng.* **10**, 959-966.
- Jung, S., Arndt, K. M., Müller, K. M. und Plückthun, A. (1999). Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations. *J. Immunol. Meth.* **231**, 93-104.
- Kadokura, H., Katzen, F. und Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 111-135.
- Kast, P. und Hilvert, D. (1997). 3D structural information as a guide to protein engineering using genetic selection. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**(4), 470-479.
- Kehoe, J. W. und Kay, B. K. (2005). Filamentous phage display in the new millenium. *Chem. Rev.* **105**, 4056-4072.
- Kerff, F., Charlier, P., Colombo, M. L., Sauvage, E., Brans, A., Frère, J. M., Joris, B. und Fonce, E. (2003). Crystal structure of the sensor domain of the BlaR penicillin receptor from *Bacillus licheniformis*. *Biochemistry* **42**(44), 12835-12843.
- Kiefhaber, T. (1995). Protein folding kinetics. *Methods Mol. Biol.* **40**, 313-341.
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. und Koide, S. (1998). The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* **284**(4), 1141-1151.
- Konings, W. N., Kaback, H. R. und Lolkema, J. S. (1995). Transport processes in eukaryotic and prokaryotic organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 57.
- Korkegian, A., Black, M. E., Baker, D. und Stoddard, B. L. (2005). Computational thermostabilization of an enzyme. *Science* **308**(5723), 857-860.
- Kramer, R. A., Cox, F., van der Horst, M., van der Oudenrijn, S., Res, P. C., Bia, J., Logtenberg, T. und de Kruij, J. (2003). A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. *Nucleic Acids Res.* **31**(11), 59.

- Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Krebber, A., Ge, L. und Plückthun, A. (1997). Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel *in vivo* selection for protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **268**(3), 607-18.
- Kremser, A. und Rasched, I. (1994). The adsorption protein of filamentous phage fd: Assignment of its disulfide bridges and identification of the domain incorporated in the coat. *Biochemistry* **33**, 13954-8.
- Kristensen, P. und Winter, G. (1998). Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold. Des.* **3**(5), 321-328.
- Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(4), 751-813.
- Lamotte-Brasseur, J., Knox, J., Kelly, J. A., Charlier, P., Fonze, E., Dideberg, O. und Frère, J. M. (1991). The structures and catalytic mechanisms of active-site serine beta-lactamases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **12**, 189-230.
- Legendre, D., Vucic, B., Hougardy, V., Girboux, A. L., Henriol, C., Van Haute, J., Soumillion, P. und Fastrez, J. (2002). TEM-1 beta-lactamase as a scaffold for protein recognition and assay. *Protein Sci.* **11**(6), 1506-1518.
- Levengood, S. K., Beyer, W. F., Jr. und Webster, R. E. (1991). TolA: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5939-43.
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45.
- Levinthal, C. (1969). How to fold gracefully. *Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems Proceedings* **67**, 22-24.
- Liu, Y., Breslauer, K. und Anderson, S. (1997). „Designing Out“ Disulfide Bonds: Thermodynamic Properties of 30-51 Cysteine Substitution Mutants of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. *Biochemistry* **36**, 5323-35.
- Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. und Makhatadze, G. I. (1999). Engineering a thermostable protein via optimization of charge-charge interactions on the protein surface. *Biochemistry* **38**(50), 16419-16423.
- Looger, L. L., Dwyer, M. A., Smith, J. J. und Hellinga, H. W. (2003). Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature* **423**, 185-190.
- Lopez, J. und Webster, R. E. (1982). Minor coat protein composition and location of the A protein in bacteriophage f1 spheroids and I-forms. *J. Virol.* **42**(3), 1099-1107.
- Lubowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. und Wlodawer, A. (1998). The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nature Struct. Biol.* **5**, 140-7.
- Lubowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. und Wlodawer, A. (1999). Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure* **7**, 711-22.
- Makhatadze, G. I. und Privalov, P. L. (1992). Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **347**, 1063-1076.
- Malakauskas, S. M. und Mayo, S. L. (1998). Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant. *Nat. Struct. Biol.* **5**(6), 470-475.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B. W., Veltmann, O. R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R., Eijssink, V. G. (1997). Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J. Biol. Chem.* **272**(17), 11152-11156.
- Martin, A., Sieber, V. und Schmid, F. X. (2001). In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J. Mol. Biol.* **309**(3), 717-726.
- Martin, A., Kather, I. und Schmid, F. X. (2002). Origins of the high stability of an in vitro-selected cold-shock protein. *J. Mol. Biol.* **318**(5), 1341-1349.
- Martin, A., Schmid, F. X. und Sieber, V. (2003a). Prosided: a phage-based method for selecting thermostable proteins. *Methods Mol. Biol.* **230**, 57-70.
- Martin, A. und Schmid, F. X. (2003b). Evolutionary stabilization of the gene-3-protein of phage fd reveals the principles that govern the thermodynamic stability of two-domain proteins. *J. Mol. Biol.* **328**(4), 863-875.
- Martin, A. und Schmid, F. X. (2003c). The folding mechanism of a two-domain protein: folding kinetics and domain docking of the gene-3-protein of phage fd. *J. Mol. Biol.* **329**, 599-610.
- Marciano, D. K., Russel, M. und Simon, S. M. (1999). An aqueous channel for filamentous phage export. *Science* **284**(5419), 1516-1519.
- Marvin, D. A. (1998). Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 150-8.
- Matsumura, M., Signor, G., Matthews, B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulfide bonds. *Nature* **342**(6247): 291-293.
- Melckebeke, H. V., Vreuls, C., Gans, P., Filee, P., Llabres, G., Joris, B. und Simorre, B. (2003). Solution structural study of BlaI: implications for the repression of genes involved in beta-lactam antibiotic resistance. *J. Mol. Biol.* **333**(4), 711-720.
- Merz, A., Yee, M. C., Szadkowski, H., Pappenberger, G., Cramer, A., Stemmer, W. P., Yanofsky, C. und Kirschner, K. (2000). Improving the catalytic activity of a thermophilic enzyme at low temperatures. *Biochemistry* **39**(5), 880-889.

- Mitchinson, C. und Wells, J. A. (1989). Protein engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN'. *Biochemistry* **28**(11), 4807-4815.
- Miyazaki, K., Wintrode, P. L., Grayling, R. A., Rubingh, D. N. und Arnold, F. H. (2000). Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* **297**(4), 1015-1026.
- Model, P. und Russel, M. (1988). Filamentous bacteriophages. In *The Bacteriophages* (Calendar, R., Ed.), 375-456, Plenum Press, New York.
- Nakamura, M., Tsumoto, K., Kumagai, I. und Ishimura, K. (2003). A morphologic study of filamentous phage infection of *Escherichia coli* using biotinylated phages. *FEBS Lett.* **536**(1-3), 167-172.
- O'Callaghan, C. und Morris, A. (1972). Inhibition of beta-lactamase by beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**(6), 442-448.
- Opalka, N., Beckmann, R., Boisset, N., Simon, M. N., Russel, M. und Darst, S. A. (2003). Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **325**(3), 461-470.
- Oscarsson, S. und Porath, J. (1989). Covalent chromatography and salt-promoted thiophilic adsorption. *Anal. Biochem.* **176**, 330-337.
- Pace, C. N. (1990). Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**(1), 14-17.
- Pace, C. N. (2000). Single surface stabilizer. *Nat. Struct. Biol.* **7**(5), 345-346.
- Palackal, N., Brennan, Y., Callen, W. N., Dupree, P., Frey, G., Goubet, F., Hazlewood, G. P., Healey, S., Kang, Y. E., Kretz, K. A., Lee, E., Tan, X., Tomlinson, G. L., Verruto, J., Wong, V. W., Mathur, E. J., Short, J. M., Robertson, D. E. und Steer, B. A. (2004). An evolutionary route to xylanase process fitness. *Protein Sci.* **13**(2), 494-503.
- Palzkill, T., Le, Q. Q., Venkatachalam, K. V., LaRocco, M. und Ocera, H. (1994). Evolution of antibiotic resistance: several different amino acid substitutions in an active site loop alter the substrate profile of beta-lactamase. *Mol. Microbiol.* **12**(2), 217-229.
- Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**(1), 2-11.
- Paschke, M. und Höhne, W. (2005). A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system. *Gene* **350**(1), 79-88.
- Perl, D. und Schmid, F. X. (2001). Electrostatic stabilization of a thermophilic cold shock protein. *J. Mol. Biol.* **313**(2), 343-357.
- Perlman, D. und Halvorson, H. D. (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* **167**(2), 391-409.
- Petrosino, J. F. und Palzkill, T. (1996). Systematic mutagenesis of the active site omega loop of TEM-1 beta-lactamase. *J. Bacteriol.* **178**(7), 1821-1828.
- Petrosino, J., Cantu, C. und Palzkill, T. (1998). β -lactamases: protein evolution in real time. *Trends Microbiol.* **6**(8), 323-327.
- Pfeil, W. und Privalov, P. L. (1976). Thermodynamic investigations of Proteins. II. Calorimetric study of lysozyme denaturation by guanidine hydrochloride. *Biophys. Chem.* **4**, 33-40.
- Poole, K. (2004). Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**(17), 2200-2223.
- Privalov, P. L. (1982). Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Advances in Protein Chemistry* **35**, 1-104.
- Privalov, P. L. (1993). Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. In *Protein folding* (Creighton, T. E., ed.), Freeman, New York.
- Proba, K., Wörn, A., Honegger, A. und Plückthun, A. (1998). Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. *J. Mol. Biol.* **275**, 245-253.
- Rakonjac, J. und Model, P. (1998). Roles of pIII in filamentous phage assembly. *J. Mol. Biol.* **282**, 25-41.
- Rakonjac, J., Feng, J.-N. und Model, P. (1999). Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. *J. Mol. Biol.* **289**, 1253-65.
- Raquet, X., Vanhove, M., Lamotte-Brasseur, J., Goussard, S., Courvalin, P. und Frère, J. M. (1995). Stability of TEM beta-lactamase mutants hydrolyzing third generation cephalosporins. *Proteins* **23**(1), 63-72.
- Reiner, A. (2004). Bildung der Disulfidbrücken bei der Faltung des Gen-3-Proteins filamentöser Phagen. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Richter, S. (2001). Biotechnologische Anwendungen polyionischer Fusionspeptide. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Riechmann, L. und Holliger, P. (1997). The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* **90**, 351-60.
- Rodi, D. J., Soares, A. S. und Makowski, L. (2002). Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phage display libraries. *J. Mol. Biol.* **322**, 1039-1052.
- Röthlisberger, D., Honegger, A. und Plückthun, A. (2005). Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J. Mol. Biol.* **347**(4), 773-789.
- Rubingh, D. N. (1997). Protein engineering from a bioindustrial point of view. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 417-422.

- Rudolph, R., Siebendritt, R., Neslauer, G., Sharma, A. K. und Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma-II-crystallin from calf eye lens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**(23), 12297-12302.
- Russel, M., Whirlow, H., Sun, T. P. und Webster, R. E. (1988). Low-frequency infection of F-bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages. *J. Bacteriol.* **170**(11), 5312-5316.
- Safo, M. K., Zhao, Q., Ko, T. P., Musayev, F. N., Robinson, H., Scarsdale, N., Wang, A. H. und Archer, G. L. (2005). Crystal structures of the BlaI repressor from *Staphylococcus aureus* and its complex with DNA: insights into transcriptional regulation of the bla and mec operons. *J. Bacteriol.* **187**(5), 1833-1844.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P.-Å und Ståhl, S. (2002). Display of proteins on bacteria. *J. Biotechnol.* **96**, 129-154.
- Santor, M. M. und Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of Phenylmethanesulfonyl-alpha-chymosin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8.
- Savard, P. Y., Gagné, S. M. (2006). Backbone dynamics of TEM-1 determined by NMR: evidence for a highly ordered protein. *Biochemistry* **45**(38), 11414-11424.
- Schägger H, von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* **166**(2), 368-79.
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. und Schmid, F. X. (1995). Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Biol.* **2**(8), 663-673.
- Schultz, S. C., Dalbadie-McFarland, G., Neitzel, J. J. und Richards, J. H. (1987). Stability of wild-type and mutant RTEM-1 beta-lactamases: effect of the disulfide bond. *Proteins* **2**(4), 290-297.
- Sevier, C. S. und Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(11), 836-847.
- Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnem, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J. C. und Marks, J. D. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(11), 6157-6162.
- Sideraki, V., Huang, W., Palzkill, T. und Gilbert, H. F. (2001). A secondary drug resistance mutation of TEM-1 beta-lactamase that suppresses misfolding and aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(1), 283-288.
- Sidhu, S. S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.* **18**(2), 57-63.
- Sieber, V., Plückthun, A. und Schmid, F. X. (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat. Biotechnol.* **16**, 955-60.
- Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P. und Yansura, D. G. (2002). Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of glycosylated antibodies. *J. Immunol. Methods* **263**(1-2), 133-147.
- Solbak, A. I., Richardson, T. H., McCann, R. T., Kline, K. A., Bartnek, F., Tomlinson, G., Tan, X., Parra-Gessert, L., Frey, G. J., Podar, M., Luginbuhl, P., Gray, K. A., Mathur, E. J., Robertson, D. E., Burk, M. J., Hazlewood, G. P., Short, J. M. und Kerovuo, J. (2005). Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectat-lyase for processing cotton fabric. *J. Biol. Chem.* **280**(10), 9431-9438.
- Smith, G. (1998). Patch engineering: a general approach for creating proteins that have new binding activities. *Trends Biochem. Sci.* **23**(12), 457-460.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**(4705), 1315-1317.
- Spector, S., Wang, M., Carp, S. A., Robblee, J., Hendsch, Z. S., Fairman, R., Tidor, B. und Raleigh, D. P. (2000). Rational modification of protein stability by the mutation of charged surface residues. *Biochemistry* **39**(5), 872-879.
- Steiner, D., Forrer, P., Stumpp, M. T. und Plückthun, A. (2006). Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nat. Biotechnol.* **24**(7), 823-831.
- Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A. und Steinbacher, S. (1994). Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J. Mol. Biol.* **240**(3), 188-192.
- Stemmer, W. P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**(6488), 389-391.
- Stengele, I., Bross, P., Garces, X., Giray, J. und Rasched, I. (1990). Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. *J. Mol. Biol.* **212**, 143-9.
- Stern, R. und Liebl, W. (2001). Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**(1), 39-106.
- Stöckl, M. T. (2005). Stabilität und Faltungsmechanismus der aminoterminalen Domänen und Charakterisierung der carboxyterminalen Domäne des Gen-3-Proteins aus dem filamentösen Phagen fd. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

- Stopar, D., Spruijt, R. B., Wolfs, C. J. und Hemminga, M. A. (1996). Local dynamics of the M13 major coat protein in different membrane-mimicking systems. *Biochemistry* **35**(48), 15467-15473.
- Takahashi, T. T., Austin, R. J. und Roberts, R. W. (2003). mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **28**(3), 159-165.
- Thornton, J. M. (1981). Disulfide bridges in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **151**, 261.
- Tobin, M. B., Gustafsson, C. und Huisman, G. W. (2000). Directed evolution: the "rational" basis for "irrational" design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**(4), 421-427.
- Tsalkova, T. N. und Privalov, P. L. (1985). Thermodynamic study of domain organization in troponin C and calmodulin. *J. Mol. Biol.* **181**(4), 533-544.
- Uversky, V. N. (2002). What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* **269**, 2-12.
- Vanhove, M., Raquet, X. und Frère, J. M. (1995a). Investigation of the folding pathway of the TEM-1 beta-lactamase. *Proteins* **22**(2), 110-118.
- Vanhove, M., Houba, S., Lamotte-Brasseur, J. und Frère, J. M. (1995b). Probing the determinants of protein stability: comparison of class A beta-lactamases. *Biochem. J.* **308**(3), 859-864.
- Vanhove, M., Guillaume, G., Ledent, P., Richards, J. H., Pain, R. H. und Frère, J. M. (1997). Kinetic and thermodynamic consequences of the removal of the Cys77-Cys123 disulphide bond for the folding of TEM-1 beta-lactamase. *Biochem. J.* **321**(Pt 2), 413-417.
- Vanhove, M., Lejeune, A., Guillaume, G., Virden, R., Pain, R. H., Schmid, F. X. und Frère, J. M. (1998a). A collapsed intermediate with nonnative packing of hydrophobic residues in the folding of TEM-1 beta-lactamase. *Biochemistry* **37**(7), 1941-1950.
- Vanhove, M., Lejeune, A. und Pain, R. H. (1998b). Beta-lactamases as models for protein-folding studies. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**(4), 372-377.
- Vihinen, M. (1987). Relationship of protein flexibility to thermostability. *Prot. Eng.* **1**(6), 477-480.
- Wang, X., Minasov, G. und Shoichet, B. K. (2002). Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs. *J. Mol. Biol.* **320**(1), 85-95.
- Webster, R. E. (1996). Biology of the filamentous bacteriophage. In *Phage Display of Peptides and Proteins* (Kay, B. K. und Winter, J., Ed.), Academic Press, New York.
- Wedemeyer, W. J., Welker, E., Narayan, M. und Scheraga, H. A. (2000). Disulfide Bonds and Protein Folding. *Biochemistry* **39**, 15429-15440.
- Weiss, G. A. und Sidhu, S. S. (2000). Design and evolution of artificial M13 coat proteins. *J. Mol. Biol.* **300**(1), 213-219.
- Weiss, G. A., Roth, T. A., Baldi, P. F. und Sidhu, S. S. (2003). Comprehensive mutagenesis of the C-terminal domain of the M13 gene-3 minor coat protein: the requirements for assembly into the bacteriophage particle. *J. Mol. Biol.* **332**(4), 777-782.
- Wenk, M. und Jaenicke, R. (1999). Calorimetric analysis of the Ca²⁺-binding beta gamma-crystallin homolog protein S from *Myxococcus xanthus*: Intrinsic stability and mutual stabilization of domains. *J. Mol. Biol.* **293**(1), 117-124.
- Wilke, M. S., Lovering, A. L. und Strynadka, N. C. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**(5), 525-533.
- Williams, K. A. und Deber, C. M. (1996). Biophysical characterization of wild-type and mutant bacteriophage Iike major coat protein in the virion and in detergent micelles. *Biochemistry* **35**(32), 10472-10483.
- Wirtz, P. und Steipe, B. (1999). Intrabody construction and expression III: engineering hyperstable V (H) domains. *Protein Sci.* **8**(11), 2245-2250.
- Wong, T. S., Roccatano, D., Zacharias, M. und Schwaneberg, U. (2006). A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J. Mol. Biol.* **355**, 858-871.
- Wunderlich, M., Martin, A. und Schmid, F. X. (2005a). Stabilization of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* by evolutionary optimization of Coulombic interactions. *J. Mol. Biol.* **347**(5), 1063-1076.
- Wunderlich, M., Martin, A., Staab, C. A. und Schmid, F. X. (2005b). Evolutionary protein stabilization in comparison with computational design. *J. Mol. Biol.* **351**(5), 1160-1168.
- Wunderlich, M. und Schmid, F. X. (2006). In vitro evolution of a hyperstable Gbetal variant. *J. Mol. Biol.* **363**(2), 545-557.
- Yu, M. W., Scott, J. K., Fournier, A. und Talbot, P. J. (2000). Characterization of murine coronavirus neutralization epitopes with phage-displayed peptides. *Virology* **271**(1), 182-196.
- Zaccolo, M. und Gherardi, E. (1999). The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *J. Mol. Biol.* **285**(2), 775-783.
- Zwick, M. B., Shen, J. und Scott, J. K. (2000). Homodimeric peptides displayed by the major coat protein of filamentous phage. *J. Mol. Biol.* **300**(2), 307-320.

9 Anhang

9.1 Verwendete Oligodesoxyribonukleotide

Die in dieser Arbeit zur Erstellung der G3P*- und β -La-Bibliotheken sowie Expressionsklone verwendeten Oligodesoxyribonukleotide sowie alle weiteren zur Erstellung verschiedener Phagenkonstrukte verwendete Primer sind in Tabelle 9.1 aufgeführt.

Tabelle 9.1: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide.

Name des Primers	Basensequenz in Richtung 5' → 3'	Mutation/ Verwendung
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Kolonie-PCR
T7 Terminator	GTTATGCTAGTTATTGCTCA	Kolonie-PCR
pTAC11 a	AAGTTTAAATCAATCTAAAG	Kolonie-PCR
pTAC11 b	CGTGTCGCCCTTATTCCCTTT	Kolonie-PCR
fdg3pN	TTATTATTCGCAATTCCTTT	Sequenzierung
fdHis b	CAACTTTCAACAGTTTCAGC	Sequenzierung
fdsseq	AGCCGCCGCCAGCGTTAACC	Sequenz., Kolonie-PCR
fdlseq	CAAGGCCAATCGTCTGACC	Sequenz., Kolonie-PCR
g3p CT sel a	GATGGTTTCATTGGTGACGT	Sequenzierung CT
g3p CT sel b	ATTTGGGAATTAGAGCCAGC	Sequenzierung CT
C36X(2)bBstF5I	TAGCATTCCACAGNDNTCCCTCATAGTTAGC	BstF5I-Schnittst. in G3P
C36X(1)bBstF5I	TAGCATTCCACAGNNBTCCCTCATAGTTAGC	BstF5I-Schnittst. in G3P
C46XC53X(2)bBtsI	GAACCCATGTACCGTANDNCTGCGTTTCGTCACCAGTND NAACTACAACGCCTG	BtsI-Schnittstelle in G3P
C46XC53X(1)bBtsI	GAACCCATGTACCGTANNBCTGCGTTTCGTCACCAGTNN BAACTACAACGCCTG	BtsI-Schnittstelle in G3P
TGT7NHN	GAAACTGTTGAAAGTNHNTTAGCAAAATCCCAT	C7X(-C)/ Phagenbib.
TGT7VNN	GAAACTGTTGAAAGTVNNTTAGCAAAATCCCAT	C7X(-C)/ Phagenbib.
ACA36NDN	TAGCATTCCACAGNDNGCCCTCATAGTTAGC	C36X(-C) / Phagenbib.
ACA36NNB	TAGCATTCCACAGNNBGCCCTCATAGTTAGC	C36X(-C) / Phagenbib.
C36X N39K (1) b BstF5I	TAGCCTTCCACAGNNBTCCCTCATAGTTAGC	Randomisierung Pos. 36 im 0SS-G3P-Phagen
C36X N39K (2)b BstF5I	TAGCCTTCCACAGNDNTCCCTCATAGTTAGC	Randomisierung Pos. 36 im 0SS-G3P-Phagen
ACA46NDN	GAACCCATGTACCGTANDNCTGAGTTTCGTCACCAGTND	C46X(-C) C53X(-C)/ Phagenbibliothek
ACA53NDN	NAACTACAACGCCTG	
ACA46NNB	GAACCCATGTACCGTANNBCTGAGTTTCGTCACCAGTNN	C46X(-C) C53X(-C)/ Phagenbibliothek
ACA53NNB	BAACTACAACGCCTG	
TGT188NHN	GGTAAATTCAGAGACNHNGCTTTCCATTCTGGC	C188X(-C) / Phagenbib.
TGT188VNN	GGTAAATTCAGAGACVNNNGCTTTCCATTCTGGC	C188X(-C) / Phagenbib.
ACA201NDN	GATTGGCCTTGATATTCNDNAACAAATAAATCCTC	C201X(-C) / Phagenbib.
ACA201NNB	GATTGGCCTTGATATTCNNBAACAAATAAATC CTC	C201X(-C) / Phagenbib.
g3p R29X N39X a	AAAACCTTTAGATNNNTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTG TGGNNNGCTACAGGC	Randomisierung Pos. 29, 39 G3P
g3p T56X b	CCCAATAGGAACCCANNNACCGTATACCTGAGT	Randomisierung Pos. 56

Name des Primers	Basensequenz in Richtung 5' → 3'	Mutation/ Verwendung
g3p L198X F199X	AGGCAGGTAAGANNNTTGGCCTTGATATTCCGC	Randomisierung Pos. 198,
S207X b	AACNNNNNNNATCCTCATTA	199, 207
g3p C354Xa1	CCTCAGTCGGTTGAANHNCGCCCTTATGTCTTT	C354X-Phagenbibliothek
g3p C354Xa2	CCTCAGTCGGTTGAAVNNCGCCCTTATGTCTTT	C354X-Phagenbibliothek
g3p C371Xb1	TAAGTTTATTTTGTCTNNBATCAATAGAAAATTC	C371X-Phagenbibliothek
g3p C371Xb2	TAAGTTTATTTTGTCTNDNATCAATAGAAAATTC	C371X-Phagenbibliothek
g3pN Nde a	GGAATTCCATATGGCTGAAACTGTTGAAAGTTG	Klonierung G3P N1N2, NdeI-Schnittstelle
g3pN (AS6) Nde a	GGAATTCCATATGGCTGAAACTGTTGAAAGT	Klonierung G3P N1N2, NdeI-Schnittstelle
g3pC His b	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCCCCGGACGGA GCATTGACAGGAGG	Klonierung G3P N1N2, BamHI-Schnittstelle
g3pN1 C His b	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGAGCATTTTCA GGGATAGCAAGCCC	Klonierung G3P N1, BamHI-Schnittstelle
g3pN(AS6)N Nde a	GGAATTCCATATGGCTGAAACTGTTGAAAGT	Klonierung G3P N1N2, NdeI-Schnittstelle
g3p N1SSNa	GGAATTCCATATGAAAAAATTATTATTCGCAATTCC	Klonierung G3P N1N2, NdeI-Schnittstelle
g3p N Nhe a	CTAGCTAGCATGGCTGAAACTGTTGAAAGT	Klonierung G3P N1N2CT
g3p N2 90 Nhe a	CTAGCTAGCATGCCTGAGTACGGTGATACACCT	Klonierung von N2-CT
g3p N2 102 Nhe a	CTAGCTAGCATGTATATCAACCCTCTCGACGGC	Klonierung von N2-CT
g3p CT N Nde a	GGAATTCCATATGGATTTTGATTATGAAAAAATGGC	Klonierung CT-Domäne
g3p CT C His b	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCGCCGCACCA CGGAATAAGTTTATTTTGTCT	Klonierung CT-Domäne
g3pCTgesCHisb	CGGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGAGACTCCTTA TTACGCAGTAT	Klonierung CT-Domäne
g3p C7S Pst Na	AAAAGCTGCAGGGTTCTGAAGCTGAAACTGTTGAAAGTA GT	Klonierung 0SS-G3P in Cys-Phagen
g3p Nde Cb	GGAATTCCATATGGTTTACCAGCGCCAAAGACAT	Klonierung 0SS-G3P in Cys-Phagen
g3pN Hind a	CCCAAGCTTATGGCTGAAACTGTTGAAAGT	Klonierung G3P, HindIII-Schnittstelle
fdg3pCTb	TAACGGAATACCCAAAAGAA	Sequenzierung CT
fdg3pCTa	GGTGATAATTCACCTTTAAT	Sequenzierung CT
C46I C53Va	CAGGCGTTGTAGTTATAACTGGTGACGAAACTCAGGTAT ACGGTACATGGGTTC	C46IC53V/ Mutagenese
C46I C53Vb	GAACCCATGTACCGTATACCTGAGTTTCGTCACCAGTTA TAACTACAACGCCTG	C46IC53V/ Mutagenese
C188Ga	GGTAAATTCAGAGACGGAGCTTTCCATTCTGGC	C188G/ Mutagenese
C201Vb	GATTGGCCTTGATATTCCACAACAAATAAATCCTC	C201V/ Mutagenese
C188Va	GGTAAATTCAGAGACGTGGCTTTCCATTCTGGC	C188V/ Mutagenese
C201Ab	GATTGGCCTTGATATTCCGCAACAAATAAATCCTC	C201A/ Mutagenese
C46A C53Aa	CAGGCGTTGTAGTTGCGACTGGTGACGAAACTCAGGCGT ACGGTACATGGGTTC	C46A C53A/Mutagenese
C46A C53Ab	GAACCCATGTACCGTACGCCTGAGTTTCGTCACCAGTCG CAACTACAACGCCTG	C46A C53A/Mutagenese

Name des Primers	Basensequenz in Richtung 5' → 3'	Mutation/ Verwendung
C7Aa	GAAACTGTTGAAAGTGC GTTAGCAAAATCCCAT	C7A/Mutagenese
C7Ab	ATGGGATTTTGCTAACGCACTTTCAACAGTTTC	C7A/Mutagenese
g3p blunt C7a	ATAGAAAATTCATTTACTAA	C7 Mutagenese
g3p C7Sb	ATGGGATTTTGCTAAACTACTTTCAACAGTTTC	C7S/Mutagenese
g3p C7Vb	ATGGGATTTTGCTAACACACTTTCAACAGTTTC	C7V/Mutagenese
g3p N15G a	ATAGAAGGTTCAATTTACTAACGTCTGGAAA	N15G/Mutagenese
V20Va	ATTCATTTACTAACGTGTGGAAAGACGACA	stille Mutation im G3P
V20Vb	TGTCGTCTTTCCACACGTTAGTAAATGAAT	stille Mutation im G3P
R29 blunt a	GGCTGTCTGTGGAATGCTAC	R29W/Mutagenese
g3p R29W b	CTCATAGTTAGCGTACCAATCTAAAGTTTTGTC	R29W/Mutagenese
C36La	GCT AAC TAT GAG GGC CTG CTG TGG AAT GCT A	C36L/Mutagenese
C36Lb	T AGC ATT CCA CAG CAG GCC CTC ATA GTT AGC	C36L/Mutagenese
g3p C36Ia	GGCATCCTGTGGAATGCTAC	C36I/Mutagenese
g3p C36Ib	TAGCATTCCACAGGATGCCCTCATAGTTAGC	C36I/Mutagenese
C36Aa	GCTAACTATGAGGGCGCGCTGTGGAATGCTA	C36A/Mutagenese
C36Ab	TAGCATTCCACAGCGCGCCCTCATAGTTAGC	C36 Mutagenese
g3p N39blunt b	CTCATAGTTAGCGTAACGAT	N39 Mutagenese
g3p C36I N39K a	GGCATCCTGTGGAAGGCTACAGGCGTTGTA	N39K/Mutagenese
g3p C36I N39R a	GGCATCCTGTGGAGGGCTACAGGCGTTGTA	N39R/Mutagenese
C46AC53La	CAGGCGTTGTAGTTGCGACTGGTGACGAAACTCAGCTGT ACGGTACATGGGTTC	C46AC53L/ Mutagenese
C46AC53Lb	GAACCCATGTACCGTACAGCTGAGTTTCGTCACCAGTCG CAACTACAACGCCTG	C46AC53L/ Mutagenese
C46I C53V a	CAGGCGTTGTAGTTATAACTGGTGACGAAACTCAGGTAT ACGGTACATGGGTTC	C46I C53V/Mutagenese
C46I C53V b	GAACCCATGTACCGTATACCTGAGTTTCGTCACCAGTTA TAACTACAACGCCTG	C46I C53V/Mutagenese
g3p G55A b	AATAGGAACCCATGTAGCGTATACCTGAGTTTC	G55A/Mutagenese
g3p C53V T56I b	AATAGGAACCCATATACCGTATACCTGAGTTTC	T56I/Mutagenese
g3p T56 blunt a	GGGCTTGCTATCCCTGAAAA	T56 Mutagenese
g3p C53V T56V b	AATAGGAACCCATACACCGTATACCTGAGTTTC	T56V/Mutagenese
g3p I60V b	AACAGGAACCCATGTACCGTATAC	I60V/Mutagenese
C188Aa	GGTAAATTCAGAGACGCGGCTTTCCATTCTGGC	C188A/Mutagenese
C188Ab	GCCAGAATGGAAAGCCGCGTCTCTGAATTTACC	C188A/Mutagenese
C188Ga	GGTAAATTCAGAGACGGAGCTTTCCATTCTGGC	C188G/Mutagenese
C201Vb	GATTGGCCTTGATATTCCACAACAAATAAATCCTC	C201V/Mutagenese
C188Va	GGTAAATTCAGAGACGTGGCTTTCCATTCTGGC	C188V/Mutagenese
C201Ab	GATTGGCCTTGATATTCCGCAACAAATAAATCCTC	C201A/Mutagenese
g3p L198P C201A a	TTTAATGAGGATCCATTTGTTGCGGAATAT	L198P/Mutagenese
C201La	GAG GAT TTA TTT GTT CTG GAA TAT CAA GGC CAA TC	C201V/Mutagenese
C201Lb	GA TTG GCC TTG ATA TTC CAG AAC AAA TAA ATC CTC	C201V/Mutagenese
g3p S207L a	TATCAAGGCCAACTGTCTTACCTGCCTCAA	S207L/Mutagenese
g3p S207 blunt b	TTCCGCAACAAATAAATCCT	S207 Mutagenese
g3p F199L a	TTTAATGAGGATTTACTGGTTGCGGAATATCAA	F199L/Mutagenese
g3p L198P F199L C201A b	TTCCGCAACTAATGGATCCTCATTAAGCC	Kombinationsvariante 0SS-G3P

Name des Primers	Basensequenz in Richtung 5' → 3'	Mutation/ Verwendung
g3p T56I I60V b	AACAGGAACCCATATAGCGTATACCTGAGTTTC	Kombinationsvariante 0SS-G3P
g3p C7 b	ATGGGATTTTGCTAAACAACCTTCAACAGTTTC	Wiedereinführen der Disulfidbrücken, C7
g3p C36 N39K b	TACAACGCCTGTAGCCTTCCACAGACAGCCCTCATAGTT AGC	Wiedereinführen der Disulfidbrücken, C36
g3p C46 C53 G55A T56I I60V a	GTTTGTACTGGTGACGAACTCAGTGTTACGCTATATGG GTTCCCT	Wiedereinführen der Disulfidbrücken, C46/C53
g3p C188 b	CCCAGAATGGAAAGCGCAGTCTCTGAATTTACC	Wiedereinführen der Disulfidbrücken, C188
g3p L198P F199L C201 a	TTTAATGAGGATCCATTAGTTTGTGAATATCAAGGCCAA	Wiedereinführen der Disulfidbrücken, C201
g3p C354Ab	AAAGACATAAGGGCGCGCTTCAACCGACTGAGG	C354A/Mutagenese
g3p C371L a	GAATTTTCTATTGATCTGGACAAAATAAACTTA	C371L/Mutagenese
g3p CT linker a	GGCTCTAGAAGCTCCGGTCTGCAGGGTTCTGAAGGTGCT ACTGGTGATTTTGCT	Schnittstellen in <i>Linker</i> N2-CT
g3p CT linker b	GGAAGGCCTACTTCCATTACCATTAGCAAGGCCGG	Schnittstellen in <i>Linker</i> N2-CT
fd linker NHis b fdgpa	TTCCTCATCCAGACCTCCGTGATGGTGATGGTGATG GGCTCTAGAAGCTCCGGTCTGCAGGGTTCTGAAGCTGAA ACTGTTGAAAGT	<i>Linker</i> in His-Phagen Schnittst. und His-Tag in Phagen
fd His ₆ b	GGAAGGCCTACTTCCGTGATGGTGATGGTGATGGGAGTG AGAATAGAAAGG	Schnittst. und His-Tag in Phagen
fd His ₁₂ b	GTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGG AGTGAGAATAGAA	N-terminaler His ₁₂ -Tag am G3P
fd His ₁₂ a	GGACACGATCATGACCACGAT	N-terminaler His ₁₂ -Tag am G3P
fd His ₁₂ (HD)8 a	CACGATCATGACCACGATCATGACGGACACGATCATGA CCACGATCATGACGGCTCTAGA	N-terminaler His ₁₂ -Tag am G3P, HD- <i>Linker</i>
fd Stu_Xba a	GGAAGTAGGCCTTCCGGCTCTAGAAGCTCCGGTCTGCAG	Schnittst. im Phagen
fd Linker HD b	GTGATGATCGTGGTCATGATCGTGTCCGTGATGGTGATG GTGATG	HD- <i>Linker</i> an N- Terminus des G3P
fd Linker LL9 b	ACCGGTGCCCCCTCCACTCCACCTCCGTGATGGTGATG GTGATG	HD- <i>Linker</i> an N- Terminus des G3P
fdg3p-SH a	GGACACGATCATGACCACGAT	N-terminales Cys G3P
fdg3p-SH b	ACAATGTGGACAGGAGTGAGAATAGAAAGGAAC	N-terminales Cys G3P
fdg3pCys b	TCCCCCGGAACAGGAGTGAGAATAGAAAGGAAC	N-terminales Cys G3P
fdg3pCysAla b	TCCCCCGGAACACGCGGAGTGAGAATAGAAAGGAAC	Ala Cys an N-Terminus vom G3P
fdg3pCys a	GGACACGATCATGACCACGATCATGACGGCTCTAGACTG CAG	Cys an N-Terminus vom G3P
fdg3p Cys7 b	TCCCCCGGAACAACAACAACAACAACAGGAGTGAG AATAGAAAGGAAC	7 Cysteine an N-Terminus vom G3P
fd Ala Cys7 b	TCCCCCGGAACAACAACAACAACAACACGCGGAGT GAGAATAGAAAGGAAC	Ala + 7 Cysteine an N- Terminus vom G3P

Name des Primers	Basensequenz in Richtung 5' → 3'	Mutation/ Verwendung
fdg3p Cys5 b	TCCCCCGGAACAACAACAACAGGAGTGAG AATAGAAAGGAAC	5 Cysteine an N-Terminus vom G3P
fdg3p ACRCR a	CGATGCAGGTCCGGGGGACACGATCATGACCACGATCA TGACGGCTCTAGA	AlaArgCysArgCys an N-Terminus des G3P
fdg3p ACRCR b	ACACGCGGAGTGAGAATAGAA	AlaArgCysArgCys an N-Terminus des G3P
fdDsbA b	AGCCAGCGCCAGCCAAATCTTTTCATGATGAAAATCTC CAAAAAAAAAAGGCTC	G3P mit DsbA-Signalsequenz
fdDsbA a	GGTTTAGTTTGTAGCGTTTAGCGCTAGCGCGGCTGAAACT GTTGAAAGT	G3P mit DsbA-Signalsequenz
fdg3p Cys Stu a	AGGCCTGGTTCTGAAGCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTA	<i>StuI</i> -Schnittstelle
fdg3p Cys Pst/Xba b	CTGCAGTCTAGAGCCGTCATGATCGTGGTCATGATCGTG TCC	<i>StuI</i> -Schnittstelle einbringen
fd Linker LL9 a	GGTTCTGAAGCTGAAACTGTTGAA	Einbau LL9-Linker
fd Linker LL9 b	ACCGGTGCCCCCTCCACTCCCACCTCCCTGCAGACCGGA GCTTCTAGAGCCACCACC	Einbau LL9-Linker
Car N a	CCGGGGCCCCAGCCGGCCGCATCTATGCAACCTCCCATC	Klonierung Carrageenase
Car C b	CCGGGGTACCCTAAGCTTCAGAGGCGTTGTTATTGCCCA CCTT	Klonierung Carrageenase
Car C98Ab	AACTTGCTGCTGATTTCGCGCCATCCCAGAATGT	C98A/Mutagenese
Car C98 blunt a	GCAAATTACCCACTTTATTA	C98 Mutagenese
Car 268Ab	TGGGTAAAATTGATTTCGCTTTCCATTGTGTATG	C268A/Mutagenese
Car C268 blunt a	TCAGCGAATAAATCAGCAGA	C268 Mutagenese
Car C98S b	AACTTGCTGCTGATTGCTGCCATCCCAGAATGT	C98S/Mutagenese
Car 268S b	TGGGTAAAATTGATTGCTTTTCCATTGTGTATG	C268S/Mutagenese
Car N <i>StuI</i> a	GGAAGGCCTGCATCTATGCAACCTCCCATC	Klonierung von Car in Phagen
Car C <i>XbaI</i> b	GCTCTAGAGTTGTTATTGCCACCTT	Klonierung von Car in Phagen
Car <i>Xba</i> a	GCTCTAGAGCATCTATGCAACCTCCCATC	Klonierung Car in Phagen
Car <i>Pst</i> b	AAAAGTGCAGGTTGTTATTGCCACCTT	Klonierung Car in Phagen
HisAF N a	CCGGGGCCCCAGCCGGCCATGCTCGTTGTCCCGGCGATA	Klonierung HisAF
HisAF C b	CCGGGGTACCCTAAGCTTCAGAGGCTCACAACCCCTCCA GTCT	Klonierung HisAF
HisFA Na	CCGGGGCCCCAGCCGGCCATGCTCGCTAAAAGAATAATC	Klonierung HisFA
HisFA C b	CCGGGGTACCCTAAGCTTCAGAGGCTTAGCGAGCATATC TCTT	Klonierung HisFA
HisF-CmutC N a	CCGGGGCCCCAGCCGGCCATGCAGAGGGTTGTCGTGGCG	Klonierung HisF-CmutC
HisF-CmutC C b	CCGGGGTACCCTAAGCTTCAGAGGCTCACAACCCCTCCA GTCT	Klonierung HisF-CmutC
HisAF <i>Xba</i> a	GCTCTAGAATGCTCGTTGTCCCGGCGAT	Klonierung von HisAF
HisAF <i>Pst</i> b	AAAAGTGCAGCAACCCCTCCAGTCTCAC	Klonierung von HisAF
HisFA C9A b	CGCCGCGATTATTCTTTTAGCGAGCAT	Cys-Ersatz HisFA
HisFA C9 a	CTCGATGTGAAAGACGGTCTGT	Cys-Ersatz HisFA
HisFA <i>Pst</i> LL9 b	AAAAGTGCAGACCGGTGCCCCCTCCACTCCCACCTCCGC GAGCATATCTCTTCATCACCTCAACTGTGAG	Einbau LL9-Linker

Name des Primers	Basensequenz in Richtung 5' → 3'	Mutation/ Verwendung
LipB fd Na neu	CCGGGGCCCAGCCGGCCATGGGTCTGCCGAGCGGTAGC	Einbau von LipB in den Phagen
LipB fd Cb neu	CCGGGGTACCCTAAGCTTCAGAGGCCGGGGTAACAATA CC	Einbau von LipB in den Phagen
LipB Xba a	GCTCTAGACTACCTTCCGGTTCGGACCCTGCCTTT	Einbau von LipaseB in den Phagen
LipB Stu b	GAAGGCCTGGGGGTGACGATGCCGGAGCA	Einbau von LipaseB in den Phagen
bLa N a	CCGGGGCCCAGCCGGCCCACCCAGAAACGCTGGTGAAA	Einbau von β-La in den Phagen
bLa C b	CCGGGGTACCCTAAGCTTCAGAGGCCCAATGCTTAATCA GTGA	Einbau von β-La in den Phagen
bLa Pst b	AAAACCTGCAGCCAATGCTTAATCAGTGAGGC	Klonierung von β-La in den Cys-Phagen
KanC Stu b	AAAAGGCCTACCGCTACACTTGCC	Kan-Resistenz in pTAC11
KanN Xba a	GCTCTAGAGTTCGGTGTAGGTCG	Kan-Resistenz in pTAC11
pTAC Stu blunt	CTGTCAGACCAAGTTTACTCA	StuI-Schnittst. in pTAC11
pTAC Xba blunt	AGCAAAAACAGGAAGGCAAA	XbaI-Schnittst. in pTAC11
pTAC Xba blunt b	TCTAGACACCCAGAAACGCTGGTGAAA	XbaI-Schnittst. in pTAC11
pTAC11 + SS Xba a	TCTAGAATGAGTATTCAACATTTCCTG	XbaI-Schnittst. in pTAC11 mit Signalseq.
pTAC11 + SS Xba blunt	ACTCTTCCTTTTCAATATTA	XbaI-Schnittst. in pTAC11 mit Signalseq.
bLa StuI b	AAAAGGCCTTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC	Klonierung β-La in pTAC11
bLa SS Xba a	GCTCTAGAATGAGTATTCAACATTTCCTG	Klonierung β-La mit Signalsequenz
bLa SS b	TTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGC A	Klonierung β-La mit Signalsequenz
bLa-Signals. Xba a	GCTCTAGAATGAGTATTCAACATTTCCTGTGCGCCCTTAT TCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGCTCACC CAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT	Klonierung β-La mit Signalsequenz
bLa M182X a	GAGCGTGACACCACGNNCCTGTAGCAATGGCA	Randomisierung Pos. 182
bLa M182Xb	TGCCATTGCTACAGGNNCGTGGTGTCACGCTC	Randomisierung Pos. 182
bLa A224Xb	CCAGCCAGCCGGAAGNNCGAGCGCAGAAGTGG	Randomisierung Pos. 224
bLa P27S a	TCAGAAACGCTGGTGAAAGTA	P27S/Mutagenese
bLa P27 blunt b	GTGAGCAAAAACAGGAAGGCA	P27 Mutagenese
bla P62S a	TCCGAAGAACGTTTTCCAATGATG	P62S/Mutagenese
bLa P62 blunt b	GCGAAAACCTCTCAAGGATCTT	P62S/Mutagenese
bLa C77 b	GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA	Wiedereinführen der Disulfidbrücke in β-La
bLa C77 V80I b	GGATAATATCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA	Wiedereinführen der Disulfidbrücke in β-La

Name des Primers	Basensequenz in Richtung 5' → 3'	Mutation/ Verwendung
bLa C123 b	GGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTAC	Wiedereinführen der Disulfidbrücke in β-La
bLa C77Aa	TTTAAAGTTCTGCTAGCGGGCGCGGTATTATCC	C77A/Mutagenese
bLa C77Ab	GGATAATACCGCGCCCGCTAGCAGAACTTTAAA	C77A/Mutagenese
bLa C77 blunt a	CGTATAGACGCCGGGCAAGA	C77 Mutagenese
bLa V80I b	GGATAAGATCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA	V80I/Mutagenese
bLa 84b	GGATAATACCGCGCCACATAG	Entfernen der Mutation an Pos. 84
bLa T118I a	CTTACGGATGGCATGATAGTAAGAGAATTATGC	T118I/Mutagenese
bLa T118 blunt b	ATGCTTTTCTGTGACTGGTG	T118 Mutagenese
bLa C123Aa	ACAGTAAGAGAATTAGCGAGTGCTGCCATAACC	C123A/Mutagenese
bLa C123Ab	GGTTATGGCAGCACTCGCTAATTCTCTTACTGT	C123A/Mutagenese
bLa C123 blunt a	ATGAGTGATAACACTGCGGC	C123 Mutagenese
bLa E147G a	GGGCTAACCGCTTTTTTGCACAAC	E147G/Mutagenese
bLa E147 blunt b	CTTCGGTCTCCGATCGTTGT	E147 Mutagenese
bLa K146R a	AGGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAC	K146R/Mutagenese
bLa K146 blunt b	CGGTCCTCCGATCGTTGTCAG	K146 Mutagenese
bLa M182Ta	GAGCGTGACACCACGACGCCTGTAGCAATGGCA	M182T/Mutagenese
bLa M182T bluntb	GTCGTTTGGTATGGCTTCCAT	M182T/Mutagenese
bLa 184a	GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCA	Entfernen der Mutation an Pos.184
bLa L201P a	GGCGAACTACTTACTCCAGCTTCCCGGCAACAA	L201P/Mutagenese
bLa L201 blunt b	AGTTAATAGTTTGCGCAACG	L201 Mutagenese
bLa L201P b	TAATTGTTGCCGGGAAGCTGG	Mutagenese
bLa I208M a	ATGGACTGGATGGAGGCGGATAAA	I208M/Mutagenese
bLa I208 blunt b	TAATTGTTGCCGGGAAGCTAG	I208 Mutagenese
bLa I247Va	GTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGT	I247V/Mutagenese
bLa I247 blunt b	GATACCGCGAGACCCACGCTC	I247V/Mutagenese
bLa S223W b	CCAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAAC	S223W/Mutagenese
bLa S223 blunt b	GCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT	S223 Mutagenese
bLa A224V a	GTCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT	A224V/Mutagenese
bLa A224T a	ACCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT	A224T/Mutagenese
bLa A224 blunt b	CGAGCGCAGAAGTGGTCCTGC	A224 /Mutagenese
bLa R240H a	CATGGGTCTCGCGGTATCATTGCA	R240H/Mutagenese
bLa R240H blunt b	CTCACCGGCTCCAGATTTATC	R240H/Mutagenese
bLa R275L a	CTAAATAGACAGATCGCTGAGATA	R275L/Mutagenese
bLa R275L b	TTCATCCATAGTTGCCTGACT	R275L/Mutagenese

In der Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide aufgeführt. Die Abkürzungen N, D, H stehen für eine Mischung von Nukleotiden an dieser Position. N: A+G+C+T; D: A+G+T; H: A+C+T. Die letzte Spalte gibt den Verwendungszweck des jeweiligen Primers an.

9.2 Enthalpie der thermischen Entfaltung der G3P*-Varianten

Die van't Hoff-Enthalpien aller G3P-Varianten in dieser Arbeit sind in Tabelle 9.2 bzw. Tabelle 9.3 aufgeführt.

Tabelle 9.2: Van't Hoff-Enthalpien der thermischen Entfaltung von Wildtyp-G3P, G3P*, sowie der selektierten 2SS-, 1SS- und 0SS-G3P*-Varianten.

Nr.	G3P-Variante	N1-N2 Fragment		isolierte N1
		$\Delta H_D(N2)$	$\Delta H_D(N1)$	ΔH_D
1	Wildtyp	621	213	244
2	G3P*	640	228	235
3	2SS-G3P* C188A/C201L	521	233	235
4	2SS-G3P* C188G	168	240	235
5	2SS-G3P* C188G/C201V	543	235	235
6	2SS-G3P* C188V/C201A/T56I	521	267	
7	2SS-G3P* C46A/C53L		833	192
8	2SS-G3P* C46G/C53I		749	193
9	2SS-G3P* C46G/C53V		812	
10	2SS-G3P* C46A/C53V		829	229
11	2SS-G3P* C46I/C53V		739	235
12	1SS-G3P*	375	61	
14	1SS-G3P* V2	654	221	
16	1SS-G3P* V4	668	187	
17	1SS-G3P* V5	682	192	
18	1SS-G3P* V6	662	183	
19	0SS-G3P* R29W/N39K	557	129	142
20	0SS-G3P* R29W/N39K/G55A/I60V/F199L	761	143	172
21	0SS-G3P* R29W/N39K/N15G/G55A/F199L	669	167	188
23	0SS-G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V/N138G/L198P/F199L/S207L	852	135	173

Angegeben sind die Entfaltungsenthalpien von Wildtyp-G3P, G3P*, sowie aller selektierten 2SS-, 1SS- und 0SS-G3P*-Varianten in kJ/mol im biphasischen Entfaltungsübergang des N1N2-Fragments nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell. Die ΔH_D -Werte der isolierten N1-Domänen entsprechen den Daten der einphasigen Entfaltung von N1 nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell. Für die 2SS-G3P*-Varianten mit substituierter Disulfidbrücke 46-53 und für einige 1SS-G3P*-Varianten sind die Übergänge nicht zu trennen. Für die 1SS-G3P*-Varianten sind die Entfaltungsenthalpien der Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell angegeben. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die N2-Domäne eine konstante Wärmekapazitätsänderung von $\Delta C_p = 10\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ und für die N1-Domäne ein konstantes ΔC_p von $1\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ angenommen. Varianten V2-V6 sind in Tabelle 3.5 näher erläutert.

Tabelle 9.3: Van't Hoff-Enthalpien der thermischen Entfaltung der OSS-G3P*-Varianten.

Nr.	G3P* Variante	N1-N2 Fragment		isolierte N1
		$\Delta H_D(N2)$	$\Delta H_D(N1)$	ΔH_D
1	Wild-type	621	213	
24	OSS G3P*		480	
25	OSS G3P* N15G		649	
26	OSS G3P* R29W		628	
27	OSS G3P* N39K		743	
28	OSS G3P* G55A		707	
29	OSS G3P* T56I		534	
30	OSS G3P* I60V		539	
31	OSS G3P* P65H		568	
32	OSS G3P* N138G		598	
33	OSS G3P* L198P		492	
34	OSS G3P* L198V		553	
35	OSS G3P* F199L		479	
36	OSS G3P* S207L		560	
19	OSS G3P* R29W/N39K	557	129	142
37	OSS G3P* R29W/N39K/T56I	762	120	
38	OSS G3P* R29W/N39K/T56I/L198P	790	104	
39	OSS G3P* R29W/T56I		644	
40	OSS G3P* R29W/L198P		564	
41	OSS G3P* R29W/N39K/F199L	689	197	142
42	OSS G3P* N39K/T56I		656	
43	OSS G3P* T56I/L198P		551	
44	OSS G3P* N39K/V53A/P65H/N138G/F199L		552	
45	OSS G3P* N39K/V53A/P65H/N138G/L198V/F199L		508	
20	OSS G3P* R29W/N39K/G55A/I60V/F199L	607	203	172
21	OSS G3P* N15G/R29W/ N39K/G55A/F199L	670	167	188
46	OSS G3P* N15G/R29W/N39K/T56I/N138G/L198P/F199L/ S207L	777	212	
23	OSS G3P* N15G/R29W/N39K/G55A/T56I/I60V/N138G/L198P/F199L/S207L	852	135	173
47	3SS-G3P* R29W	549	335	251

Angegeben sind die Entfaltungsenthalpien aller OSS-G3P*-Varianten in kJ/mol im biphasischen Entfaltungsübergang des N1N2-Fragments nach Auswertung gemäß einem Dreizustandsmodell. Die ΔH_D -Werte der isolierten N1-Domänen entsprechen den Daten der einphasigen Entfaltung von N1 nach Auswertung gemäß einem Zweizustandsmodell. Für die Auswertung der Entfaltungsübergänge wurde für die N2-Domäne eine konstante Wärmekapazitätsänderung von $\Delta C_p = 10\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ und für die N1-Domäne ein konstantes ΔC_p von $1\,000\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ angenommen. Varianten V2-V6 sind in Tabelle 3.5 näher erläutert.

9.3 Daten zur Kristallstruktur des stabilisierten disulfidfreien G3P*

Die Daten zur Kristallstruktur des stabilisierten OSS-G3P* sind in Tabelle 9.4 aufgeführt.

Tabelle 9.4: Statistik der Diffraktionsdaten und der Strukturverfeinerung des Kristalls von OSS-G3P* mit allen stabilisierenden Mutationen (R. Jakob, Bayreuth).

Totale/Unabhängige Reflexe	197032/40287
R_s^a	0.095 (0.441)
Auflösungsgrenze (Å)	20- 1.80 (1.9-1.8)
Vollständigkeit	99.5 (96.5)
$I / \sigma(I)$	13.8 (3.8)
Modell R/R_{free} -Faktor (%) ^b	23.4/27.6
Standardabweichung von idealer Geometrie	
Bindungslängen (Å)	0.0086
Bindungswinkel (Å)	1.5
Ramachandran Analyse (%), am meisten favorisierte Region, erlaubte Region, generell erlaubte Region, unerlaubte Region	81.9/18.1/0.0/0.0

^a $R_s = \sum h \sum i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum h \sum i I_i(h)$; wobei i die unabhängigen Beobachtungen der Reflexion h sind.

^b Der R_{free} -Faktor wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig entfernt wurden, bevor die Verfeinerung ausgeführt wurde.

9.4 DNA-Sequenzen der Phagen-Konstrukte mit N-terminalem His₆-Tag

Die DNA-Sequenz des Phagen mit N-terminalem His-Tag ist in Abbildung 9.1 angegeben.

5'-ATG AAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTTCCTTTCTATTCTCACTCC

Signalsequenz G3P Phage

CATCACCATCACCATCAC GGA AGT AGGCCT TCC GGC TCTAGA

His₆ Gly Ser StuI Ser Gly XbaI

CTGCAG GGTTCCTGAA GCTGAA.....-3'

PstI Gly Ser Glu N1-G3P

Abbildung 9.1: DNA-Sequenz des Phagen mit N-terminalem His-Tag. Angegeben sind die Codons der Signalsequenz, des His₆-Tags und des *Linker*-Bereichs mit den Restriktionsschnittstellen zum späteren Einbau von Gastproteinen.

Um die Voraussetzungen für eine Bindung zu verbessern, wurde zusätzlich der *Linker* zwischen His₆-Tag und Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme verändert. Hier wurden verschiedene *Linker* eingebaut: codierende Sequenz für GLDQQ (*Linker* aus der Publikation von Woolfson et al.), LL9-Linker mit der Aminosäuresequenz GGGSGGGTG (DNA-Sequenz: GGAGGTGGGAGTGGAGGGGGCACCGGT) und (HisAsp)₄-*Linker*. Die DNA-Sequenz des entsprechenden Phagen ist in Abbildung 9.2 dargestellt.

5'-ATG AAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTTCCTTTCTATTCTCACTCC

Signalsequenz g3p Phage

CATCACCATCACCATCAC GGA CACGATCATGACCACGATCATGAC GGC

His₆ Gly (HD)₄ Gly

TCTAGA CTGCAG GGTTCCTGAA GCTGAA.....-3'

XbaI PstI Gly Ser Glu N1-g3p

Abbildung 9.2: DNA-Sequenz des Phagen mit N-terminalem His-Tag. Angegeben sind die Codons der Signalsequenz, des His₆-Tags und des veränderten *Linker*-Bereichs mit den Restriktionsschnittstellen zum späteren Einbau von Gastproteinen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2002 bis Februar 2007 am Lehrstuhl Biochemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Franz X. Schmid angefertigt. Bei ihm möchte ich mich sehr herzlich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanken. Er hatte durch zahlreiche Ratschläge und Ideen maßgeblichen Anteil am Entstehen dieser Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit und eine schöne Zeit im Labor möchte ich meinen Laborkolleginnen und -kollegen Jochen Balbach, Barbara Eckert, Roman Jakob, Christian Löw, Christine Magg, Andreas Martin, Michael Wunderlich und Markus Zeeb danken.

Für ihren Einsatz im Rahmen von Mitarbeiterpraktika und Diplomarbeiten möchte ich mich bei Christian Bippes, Stefan Lorenz, Martin Stöckl und Stephanie Thoms bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Andreas Martin für die Einführung in die Methoden des *phage display*, sowie Barbara Eckert und Stefan Lorenz für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Herzlich danken möchte ich außerdem Roman Jakob und Prof. Dr. Holger Dobbek für die Bestimmung der Kristallstruktur meiner Proteinvariante.

Torsten Becker sei für die gemeinschaftliche Meßaktion herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinen Brüdern Jochen, Lutz und Axel für die große Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, daß ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 07. März 2007